



Mestrado em Processos Químicos e Biológicos

---

## **Aplicação de micro-PIV em estudos de hemodinâmica**

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em  
Processos Químicos e Biológicos

**Autor**

**Patrícia Arrifano Alexandre**

**Orientador**

**Professora Maria Nazaré Coelho Marques Pinheiro**

Professora do Departamento de Engenharia Química e Biológica  
Instituto Superior de Engenharia de Coimbra

**Coimbra, maio, 2018**



*A vida é tudo menos uma chama fugaz.  
É uma espécie de magnífica tocha ardente que empunho neste momento  
e que eu quero que brilhe o mais possível antes de a passar às gerações futuras.*

George Bernard Shaw



# Agradecimentos

A concretização do presente trabalho não era possível sem a colaboração e apoio de várias pessoas, que de diferentes formas me ajudaram na realização do mesmo e às quais não posso deixar de prestar o meu reconhecimento.

À Professora Nazaré Pinheiro, pela orientação, disponibilidade, conhecimento e atenção que sempre me prestou. Por ter sido um elemento fundamental, não só ao longo da realização deste trabalho, mas também no meu percurso académico enquanto aluna do ISEC. Uma Professora, mas acima de tudo uma pessoa, a quem eu agradeço todos os ensinamentos que jamais esquecerei.

À Professora Laura Santos, pela orientação, ensinamento, ajuda e sobretudo, paciência e disponibilidade para principalmente desbravar o caminho que por vezes parecia incerto.

Ao colega e amigo Diogo Julião, que caminhou lado a lado comigo nesta batalha onde por fim a conquistámos com apoio e solidariedade mútua, onde o sucesso de um só foi possível pelo sucesso do outro.

A todos aqueles que no dia-a-dia me fizeram sentir em casa nestes meses de trabalho e por toda a ajuda que cada um, à sua própria maneira, me ofereceu, nomeadamente a Eng<sup>a</sup> Martine e a D. Olinda.

Quero agradecer ainda aos colegas de curso, mas principalmente aos amigos da minha vida que me acompanharam ao longo destes anos e que estiveram presentes quando realmente faziam falta.

E por último, mas não para último, quero agradecer a um conjunto de pessoas muito especiais para mim.

Ao Diogo Franco, meu companheiro de vida, que sempre me apoiou e me ajudou incansavelmente a alcançar os meus objetivos. Por sempre ter acreditado em mim e nas minhas capacidades, mesmo quando eu própria não era capaz de o fazer.

Aos meus pais pela amizade, dedicação e ajuda que sempre me deram e a confiança inabalável que em mim depositam. Ao meu irmão por ser o meu melhor amigo em todas as ocasiões imagináveis.

A todos,  
O meu sincero obrigado.



## Resumo

O presente trabalho teve como objetivo a caracterização do escoamento de um fluido com propriedades físicas (massa volúmica e viscosidade) semelhantes à do sangue em canais retos de secção circular com dimensões próximas das veias. A técnica (ótica não intrusiva) de visualização usada para o desenvolvimento deste estudo foi a velocimetria por imagem de micropartículas (micro-PIV).

Pelo facto de se tratar de uma técnica de execução complexa, e de não existir trabalho realizado com este equipamento específico, foi necessário um período inicial de familiarização com o equipamento e técnica de micro-PIV, assim como, com o respetivo *software* de tratamento de imagens (*DynamicStudio*). Foi necessário proceder à otimização das condições de operação a usar nas medições de velocidade e também desenvolver uma metodologia eficaz para o tratamento das imagens obtidas. Este estudo preliminar foi realizado utilizando um microcanal de acrílico cedido pelo fornecedor do equipamento de micro-PIV, a *Dantec Dynamics*.

Concluída esta fase, o objetivo da aplicação desta técnica na área da medicina e, em particular, ao estudo da hemodinâmica passou a ser possível, simulando o escoamento do sangue nas veias e artérias em microcanais. Para isso, utilizou-se um canal reto de PDMS (polidimetilsiloxano), onde se estudou o escoamento de uma solução com propriedades reológicas semelhantes ao sangue (solução aquosa de DMSO a 52% (w/w)) e que simultaneamente apresentava um índice de refração igual ao do material do canal.

As imagens obtidas foram tratadas, com o objetivo de se obter perfis de velocidade que caracterizassem o escoamento do fluido no microcanal. Estes perfis foram integrados numericamente, utilizando dois métodos de cálculo diferentes, de modo a obter o caudal de escoamento e posteriormente compará-lo com o que tinha sido imposto na bomba de seringa. A constatação de que a qualidade dos resultados obtidos dependia da semelhança do índice de refração do fluido usado e do material de que é feito o canal onde ocorre o escoamento, fez com que este aspeto constituísse um objeto de estudo adicional neste trabalho.

Palavras-chave: micro-PIV, hemodinâmica, microfluídica, mecânica de fluidos.





# Abstract

The aim of the present work was to characterize the flow of a fluid with physical properties (density and viscosity) similar to the blood, in circular straight channels with dimensions close to veins. The visualization technique (optics and non-intrusive) used during the development of this study was the microparticle image velocimetry (micro-PIV).

As the technique used is complex in execution and existed a lack of work with this kind of equipment, an earlier period was required for familiarization with the equipment and the micro-PIV technique, as well as with the image processing software (DynamicStudio). It was necessary to optimize the operation conditions to use for fluid velocity measurement and to develop an effective methodology for processing the acquired images. This preliminary study was conducted using an acrylic microchannel provided by the equipment supplier, Dantec Dynamics.

With that preliminary stage completed, the application of the technique in the medicine field, particularly in hemodynamic studies was made possible by simulating the blood flow in veins and arteries with microchannels. A PDMS straight channel was used and it was studied the flow of a solution with rheological properties similar to blood (an aqueous solution of DMSO, 52% w/w) and simultaneously presenting a refractive index equal to the one of the channel's material.

The images acquired were treated with the purpose to obtain velocity profiles for the fluid flow characterization in the microchannel. These profiles were integrated numerically, using two different methodologies, in order to obtain the flow rate and then were compared the value imposed on the syringe pump. The finding that the quality of the results depended on the similarity of the refractive index of the fluid used and the material of the channel where the flow occurs, made this aspect an additional object of study in this work.

Keywords: micro-PIV, hemodynamics, microfluidic, fluid mechanics



# Índice

1. Enquadramento e âmbito do trabalho.....	17
2. Introdução .....	20
2.1. Sistema circulatório .....	20
2.2. Algumas noções de mecânica de fluidos .....	24
2.3. Técnicas de caracterização de escoamentos .....	28
2.3.1. Princípios da técnica PIV .....	29
2.3.2. Princípios da técnica de micro-PIV .....	32
3. Materiais e métodos.....	39
3.1. Sistema de micro-PIV .....	39
3.1.1. Partículas fluorescentes .....	40
3.1.2. Microscópio invertido e câmara .....	40
3.1.3. Sistema de iluminação .....	42
3.1.4. Sincronização.....	43
3.2. Equipamento auxiliar.....	43
3.3. Dispositivos microfluídicos e fluidos utilizados.....	44
3.4. Procedimento experimental .....	45
3.4.1. Aquisição de imagens.....	45
3.4.2. Tratamento das imagens adquiridas .....	48
4. Resultados e discussão .....	53
4.1. Calibração dos botões do microscópio .....	54
4.2. Canal de acrílico .....	57
4.2.1. Controlo do caudal pela diferença de altura da superfície livre do fluido em duas seringas.....	57
4.2.2. Controlo do caudal através da bomba de seringa .....	63
4.3. Canal de PDMS .....	72
4.3.1. Aferição da reprodutibilidade da técnica de micro-PIV na caracterização do escoamento.....	76
4.3.2. A influência do índice de refração nas medições .....	77
5. Conclusão .....	81
Bibliografia.....	83
Anexo A - Calibração dos botões do microscópio .....	89
Anexo B - Dimensões do canal de acrílico.....	92
Anexo C - Determinação do caudal volumétrico por medição experimental.....	93
Anexo D - Calibração da bomba de seringa .....	94



# Índice de figuras

Figura 1 - Aspeto visual do sangue antes e após centrifugação (tubo da esquerda e da direita, respetivamente) (Rudmann, 2005). .....	21
Figura 2 - Evolução da proporção de óbitos pelas principais causas de morte no total das causas de morte em Portugal (%) (1988-2015) (DGS, 2017). .....	22
Figura 3 - Proporção de óbitos devido às principais causas de morte na Europa, durante o ano de 2015, no género (a) masculino e (b) feminino (Townsend, et al., 2016). .....	22
Figura 4 - Ilustração das artérias coronárias (Loukas, et al., 2009). .....	23
Figura 5 - Estágios de progressão da aterosclerose: (a) início da lesão; (b) lesão intermédia; (c) lesão vulnerável à rutura; (d) lesão avançada obstrutiva (Costa, 2016). .....	23
Figura 6 - Escoamento de um fluido entre uma placa fixa e outra móvel onde se ilustra a resistência ao escoamento devido à viscosidade do fluido. ....	25
Figura 7 - Comportamento reológico do plasma e do sangue (Costa, 2016). .....	26
Figura 8 - Deformação <i>in vivo</i> dos glóbulos vermelhos ao longo de um capilar (Minamiyama, 2000). .....	27
Figura 9 - Variação da viscosidade do sangue com o diâmetro do vaso sanguíneo (Koeppen & Staton, 2008). .....	28
Figura 10 - Equipamento convencional de PIV e ilustração do método de correlação cruzada para tratamento das imagens adquiridas (DANTEC, 2015). .....	30
Figura 11 - Equipamento convencional de micro-PIV e ilustração do método de correlação cruzada para tratamento das imagens adquiridas (DANTEC, 2015). .....	33
Figura 12 - Diferença entre as técnicas PIV e micro-PIV no modo de iluminação (Costa, 2009). .....	34
Figura 13 - Imagens adquiridas por: (a) técnica de PIV e (b) técnica de micro-PIV. ....	35
Figura 14 - Sistema de micro-PIV usado no trabalho experimental. ....	39
Figura 15 - Microscópio ótico invertido com a câmara acoplada. ....	41
Figura 16 - Modo de operação da técnica de micro-PIV (DANTEC, 2015). ....	41
Figura 17 - Laser Nd:YAG: (a) corpo do laser; (b) cabeça do laser. ....	42
Figura 18 - Bomba de seringa. ....	43
Figura 19 - Canais utilizados: (a) canal de acrílico; (b) canal de PDMS. ....	44
Figura 20 - Focagem da face inferior da placa do microcanal. ....	46
Figura 21 - Ajuste da potência do laser: aquisição de imagens em (a) modo low; (b) modo high. ....	47
Figura 22 - Ajuste do tempo entre pulsos: (a) imagem adquirida (b) colocação de uma grelha que permite verificar se as partículas se deslocam cerca de 25% da AI. ....	47
Figura 23 - Sequência do tratamento das imagens: (a) imagem adquirida (b) média dos 100 pares de imagens adquiridos (c) subtração das duas imagens (a e b). ....	48
Figura 24 - Processo de identificação das partículas em pares de imagens consecutivos e determinação do respetivo pico de correlação (Kiger, 2005). ....	49
Figura 25 - Obtenção do pico de correlação a partir dos 100 pares de imagens (Dantec Dynamics, 2015). ....	49
Figura 26 - Obtenção do vetor velocidade utilizando o algoritmo <i>average correlation</i> (Dantec Dynamics, 2015). ....	50
Figura 27 - Determinação do valor de <i>scale factor</i> . ....	51
Figura 28 - Deslocamento do revólver (mm), por volta, em função do número de voltas dadas no botão micrométrico do microscópio, usando o comparador de menor resolução (0,01 mm). ....	55
Figura 29 - Deslocamento do revólver (mm), por volta, em função do número de voltas dadas no botão micrométrico do microscópio, usando o comparador com maior resolução (0,002 mm). ....	56

Figura 30 - <i>Kit</i> microfluídico cedido pelo fornecedor do equipamento de micro-PIV. ....	58
Figura 31 - Mapa de vetores obtido para o ensaio realizado com o canal de acrílico onde se controlou o caudal de escoamento pela diferença de alturas entre duas seringas e o plano de focagem foi de 0,910 mm. ....	60
Figura 32 - Comparação dos perfis de velocidade para planos de focagem diferentes obtidos com o canal de acrílico, onde se controlou o caudal de escoamento pela diferença de alturas entre duas seringas. ....	61
Figura 33 - Comparação dos perfis de velocidade para os quatro planos de focagem onde se obteve uma velocidade mais elevada, entre 0,880 mm e 0,910 mm, obtidos com o canal de acrílico e onde se controlou o caudal de escoamento pela diferença de alturas entre duas seringas. ....	61
Figura 34 - Comparação dos perfis de velocidade normalizados para os quatro planos de focagem onde se obteve uma velocidade mais elevada (entre 0,880 mm e 0,910 mm), obtidos com o canal de acrílico e onde se controlou o caudal de escoamento pela diferença de altura entre duas seringas, com o perfil de velocidade teórico do regime laminar. ....	62
Figura 35 - Mapa de vetores obtido para o ensaio realizado com o canal de acrílico onde se impôs um caudal de escoamento de 0,10 mL/min na bomba de seringa e o deslocamento da objetiva foi de 0,910 mm. ....	64
Figura 36 - Representação do perfil de velocidade em diferentes localizações de $y$ para o ensaio realizado com o canal de acrílico, onde se impôs um caudal de escoamento de 0,10 mL/min na bomba de seringa e o deslocamento da objetiva foi de 0,910 mm. ....	65
Figura 37 - Comparação dos perfis de velocidade para planos de focagem diferentes, obtidos com o canal de acrílico e onde se impôs um caudal de escoamento de 0,10 mL/min na bomba de seringa. ....	65
Figura 38 - Comparação dos perfis de velocidade de duas experiências para os quatro planos de focagem onde se obteve uma velocidade mais elevada (entre 0,880 mm e 0,910 mm), obtidos com o canal de acrílico, onde numa se controlou o caudal de escoamento pela diferença de alturas entre duas seringas e noutra se impôs 0,10 mL/min na bomba de seringa. ....	66
Figura 39 - Comparação dos perfis de velocidade normalizados para os quatro planos de focagem onde se obteve uma velocidade mais elevada (entre 0,880 mm e 0,910 mm), obtidos com o canal de acrílico e onde se impôs um caudal de escoamento de 0,10 mL/min na bomba de seringa, com o perfil de velocidade teórico do regime laminar. ....	67
Figura 40 - Comparação do perfil de velocidades obtido para um plano focal de 0,910 mm em experiências diferentes mas realizadas em iguais condições. ....	67
Figura 41 - Mapa de vetores obtido para o ensaio realizado com o canal de acrílico onde se impôs um caudal de escoamento de 0,50 mL/min na bomba de seringa e o deslocamento da objetiva foi de 0,910 mm. ....	69
Figura 42 - Comparação dos perfis de velocidade obtidos para os 16 ensaios realizados com o canal de acrílico onde se impôs um caudal de escoamento de 0,50 mL/min na bomba de seringa. ....	70
Figura 43 - Mapa de vetores obtido para a experiência realizada com o canal de acrílico onde se impôs um caudal de escoamento de 0,50 mL/min na bomba de seringa e o deslocamento da objetiva foi de (a) 1,092 mm e (b) 1,292 mm. ....	71
Figura 44 - Mapa de vetores obtido para o ensaio realizado com o canal de PDMS onde se impôs um caudal de escoamento de 15,0 mL/min na bomba de seringa e para um deslocamento do revólver de 1,504 mm. ....	73
Figura 45 - Representação do perfil de velocidade para diferentes valores de $y$ para o ensaio realizado com o canal de PDMS, onde se impôs um caudal de escoamento de 15,0 mL/min na bomba de seringa e o deslocamento da objetiva foi de 1,504 mm. ....	74
Figura 46 - Comparação dos perfis de velocidade para os cinco planos de focagem, entre 1,500 mm e 1,508 mm, obtidos com o canal de PDMS, onde se impôs um caudal de escoamento na bomba seringa de 15,0 mL/min. ....	74

Figura 47 - Comparação dos perfis de velocidade normalizados para os cinco planos de focagem, entre 1,500 mm e 1,508 mm, obtidos com o canal de PDMS, onde se impôs um caudal de escoamento na bomba de seringa de 15,0 mL/min, com o perfil de velocidade teórico do regime laminar.....	75
Figura 48 - Comparação dos perfis de velocidade de três experiências realizadas em iguais condições, com o canal de PDMS, para o plano de focagem do eixo do canal, 1,504 mm, onde se impôs um caudal de escoamento de 15,0 mL/min na bomba de seringa. ....	76
Figura 49 - Canal de PDMS onde se colocou uma porção da solução de DMSO a 52% (w/w) para evidenciar o efeito do índice de refração. ....	78
Figura 50 - Imagens da aplicação da técnica de micro-PIV adquiridas com o canal de PDMS (a) com água e (b) com uma solução de DMSO a 52% (w/w). ....	79





# Índice de Tabelas

Tabela 1 - Principais vasos sanguíneos existentes no sistema circulatório e respectivas funções (Cidre, 2008).....	21
Tabela 2 - Dimensões típicas das artérias coronárias esquerda e direita.....	24
Tabela 3 - Técnicas de medição de velocidade em escoamento de fluidos (Sengupta, 2007). ..	29
Tabela 4 - Características técnicas da câmara FlowSense4M. ....	41
Tabela 5 - Especificações das objetivas utilizadas. ....	42
Tabela 6 - Características do laser. ....	43
Tabela 7 - Características da bomba seringa. ....	44
Tabela 8 - Características dos dois canais utilizados e dos fluidos a 20°C. ....	45
Tabela 9 - Condições da técnica de micro-PIV usadas nos ensaios realizados com o canal de acrílico, onde se controlou o caudal de escoamento do fluido através da diferença de altura entre duas seringas.....	59
Tabela 10 - Deslocamento do revólver do microscópio usado em cada ensaio, contabilizado após a focagem da face inferior da placa do microcanal.....	59
Tabela 11 - Valores do caudal volumétrico obtidos por integração numérica e pela velocidade média de escoamento na experiência realizada com o canal de acrílico e onde se controlou o caudal pela diferença de alturas entre duas seringas. ....	63
Tabela 12 - Valores do caudal volumétrico calculado por integração numérica e pela velocidade média de escoamento da água, para as duas experiências realizadas em iguais condições e onde se impôs um caudal de escoamento de 0,10 mL/min. ....	68
Tabela 13 - Condições usadas na aquisição das imagens com o sistema de micro-PIV nos ensaios realizados com o canal de acrílico e onde se impôs um caudal de escoamento de 0,50 mL/min na bomba de seringa. ....	69
Tabela 14 - Valores do caudal obtidos por integração numérica e pela velocidade média de escoamento para a experiência realizada com um caudal de 0,5 mL/min.....	70
Tabela 15 - Condições usadas na aquisição das imagens com o sistema de micro-PIV nos ensaios realizados com o PDMS e onde se impôs um caudal de escoamento de 15,0 mL/min na bomba de seringa. ....	72
Tabela 16 - Plano de focagem do microscópio em cada ensaio, contabilizado após a focagem da face inferior da placa do microcanal de PDMS. ....	73
Tabela 17 - Valores da determinação do caudal volumétrico por integração numérica e pela velocidade média de escoamento nos ensaios realizados com o canal de PDMS e onde impôs um caudal de escoamento na bomba de seringa de 15,0 mL/min. ....	75
Tabela 18 - Valores da determinação do caudal volumétrico por integração numérica e pela velocidade média de escoamento para as três experiências realizadas em iguais condições e onde se impôs um caudal de escoamento na bomba de seringa de 15,0 mL/min. ....	76
Tabela 19 - Valores de desvio padrão e variância para o caudal volumétrico (determinado por integração numérica e pela velocidade média de escoamento) entre as três experiências realizadas em iguais condições e onde se impôs um caudal de escoamento na bomba de seringa de 15,0 mL/min. ....	77



## Simbologia

$\tau$  - Tensão de corte  
 $\gamma$  - Taxa de deformação  
 $\mu$  - Viscosidade do fluido  
 $\rho$  - Massa volúmica do fluido  
 $D$  - Diâmetro  
 $v$  - Velocidade média de escoamento do fluido  
 $Re$  - Número de Reynolds  
 $\dot{Q}$  - Caudal volumétrico  
 $u_{máx}$  - Velocidade máxima de escoamento  
 $R$  - raio  
 $r$  - Direção radial  
 $A$  - Área aberta ao escoamento  
 $u(r)$  - Velocidade local segundo a direção radial  
 $M$  - Ampliação da lente  
(w/w) - Percentagem peso/peso  
(w/v) - Percentagem peso/volume

## Abreviaturas

PIV - *Particle Image Velocimetry*  
Micro-PIV - *Micro-particle Image Velocimetry*  
CCD - *Charge Coupled Device*  
CMOS - *Complementary Metal Oxide Semicondutor*  
AI - Área de interrogação  
DMSO - Dimetil sulfóxido  
PDMS - Polidimetilsiloxano  
LDL - Lipoproteína de baixa densidade (*low-density lipoprotein*)  
W.D. - Distância de trabalho (*working distance*)



# 1. Enquadramento e âmbito do trabalho

A microfluídica, ou mecânica de fluidos à escala microscópica, é uma área específica da mecânica de fluidos que visa o estudo de escoamentos de fluidos em geometrias com dimensões características inferiores a um milímetro e superiores a um micrómetro. Os estudos, e consequente aplicação prática, à escala micrométrica com finalidades diversas nesta área têm vindo a vulgarizar-se.

A primeira aplicação remonta à década de 50 do século passado quando surgiu a impressora a jato de tinta com o objetivo de diminuir o consumo e desperdícios de tinta nas impressões. O aparecimento da primeira microbomba deu-se na década de 80 e com ela surgiram importantes avanços nos sistemas microfluídicos, uma vez que viabilizaram o uso de menores caudais de fluido (Haeberle, et al., 2007). São, por isso, muitas as áreas tecnológicas que estão conscientes do potencial de dispositivos de microfluídica: as indústrias de produção de energia elétrica, de climatização de espaços, de processos de arrefecimento, química, biomédica, laboratórios de análises clínicas, etc (Bayraktar, et al., 2006). Contudo, o principal interesse pela microfluídica surge do facto de esta proporcionar ferramentas para análises (químicas, biológicas, biomédicas) e de diagnóstico clínico com um largo leque de vantagens sobre as tecnologias existentes (Costa, 2016).

As vantagens inerentes à utilização deste tipo de geometrias justificam a crescente importância dada ao seu estudo. A diminuição das dimensões características destas geometrias leva a uma maior facilidade de transporte, capacidade de integração nas mais variadas aplicações, redução dos desperdícios gerados no fabrico e redução do tempo despendido no decurso das tarefas a eles destinados. É de referir, ainda, que o aumento da razão área superficial/volume associado a estas geometrias, comparativamente às de macroescala, é responsável pelo aumento da eficiência no que diz respeito aos processos dependentes de fenómenos de transporte de quantidade de movimento, energia e massa junto das superfícies (Wu, et al., 1984; Peng, et al., 2006). Devido ao facto dos dispositivos de microfluídica possuírem uma dimensão reduzida, e dos escoamentos no seu interior ocorrerem, na maioria dos casos, com velocidades baixas, o número de Reynolds é, em geral, da ordem das unidades, pelo que o regime do escoamento será laminar (Bayraktar, et al., 2006). Por outro lado, o facto das forças de inércia, ou da gravidade, perderem relevo face às forças de tensão superficial em escoamentos neste tipo de geometrias, acarreta algumas dificuldades no seu estudo e no estabelecimento de paralelismos com a teoria em macroscópica (Gad-el-Hak, 1999; Hetsroni, et al., 2005; Kandlikar, et al., 2006).

A percepção de que as características do sangue se modificam quando um indivíduo adoece surgiu na Grécia antiga. Apesar disso, o estudo do sangue não mereceu progressos relevantes até ao século XVII. Foi motivado pelo estudo do escoamento do sangue que, Jean Marie Poiseuille (1797-1869) desenvolveu o modelo para o escoamento de fluidos no interior de canais circulares de pequenos diâmetros. No entanto, como na altura não existiam métodos de conservação do sangue, este coagulava, obrigando Poiseuille a basear os seus estudos em fluidos conhecidos, como a água e o álcool. O culminar dos seus estudos deu origem à Lei de Poiseuille. Este foi ainda o primeiro a perceber que o sangue não teria um escoamento semelhante ao da água, o que mais tarde se veio a confirmar pelo facto de o sangue ter um comportamento não-Newtoniano. As descobertas de Poiseuille são tidas como o ponto de partida para o desenvolvimento da hemoreologia como ciência (Rampling, 2007).

Foi no século XX que se deu um grande avanço no estudo do escoamento do sangue, em grande parte devido aos progressos tecnológicos que se fizeram sentir. O aparecimento de ferramentas que permitiam uma melhor visualização dos fenómenos relativos ao escoamento dos fluidos, aliado ao desenvolvimento da microfluídica, possibilitou uma crescente compreensão dos mecanismos associados ao escoamento do sangue (Rampling, 2007; Adrian, 2005). Nas últimas duas décadas, a necessidade de um conhecimento mais aprofundado dos fenómenos envolvidos nos escoamentos em geometrias microscópicas levou ao desenvolvimento progressivo de métodos de visualização e de ferramentas de análise de dados. Na maioria dos casos, o desenvolvimento destas técnicas baseia-se na modificação de técnicas de visualização de escoamentos já utilizadas para a escala macroscópica. Um exemplo disto é a adaptação da técnica PIV (*Particle Image Velocimetry*) à visualização de escoamentos à microescala, que se passou a designar por micro-PIV (*micro-Particle Image Velocimetry*).

O mais recente avanço na microfluídica com aplicação na área da medicina, deve-se ao desenvolvimento e implementação de plataformas *Lab-on-a-Chip* e *Lab-on-a-CD*. Estes são sistemas microfluídicos avançados onde é possível promover uma série de processos (separações, misturas, reações) indispensáveis ao estudo nesta área. O uso destes dispositivos para análises clínicas apresenta inúmeras vantagens, começando pela diminuição do volume de amostra necessário, o que permite uma diminuição dos reagentes utilizados e consequentemente a possibilidade de um maior controlo do processo e com menor tempo de resposta. Aliado a todos os benefícios enumerados, existe ainda a vantagem do baixo custo destes sistemas, tanto na utilização como no fabrico (Gad-el -Hak, 2005; Verpoorte, et al., 2003; Haeberle, et al., 2007; Costa, 2009).

Na maioria das aplicações, o material constituinte destes dispositivos é o polímero polidimetilsiloxano, ou PDMS. Este é um material relativamente barato e que apresenta uma grande flexibilidade pois permite uma fabricação simples e rápida. Para além disso, este é um material biocompatível, o que significa que quando em contacto com fluidos biológicos, como o sangue, permanece inerte. Esta condição permite que o PDMS seja amplamente utilizado nestas análises (Pihl, et al., 2005; Whitesides, 2006; Lima, et al., 2008; Costa, 2016). As plataformas microfluídicas vieram, assim, viabilizar o estudo e desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico clínico, sendo o sangue um dos fluidos corporais com mais informação clínica, fazendo com que seja o fluido mais analisado para efeitos de diagnóstico (Gad-el -Hak, 2005; Toner, et al., 2005; Rampling, 2007). Em particular, estudos de hemodinâmica com o objetivo de caracterizar a distribuição da tensão de corte nas paredes e os padrões de escoamento do sangue em artérias saudáveis e com estenose (obstrução devido à deposição de substâncias gordas na parede arterial) são importantes para a compreensão e prevenção da aterosclerose.

O presente trabalho teve como objetivo a caracterização do escoamento de um fluido com propriedades físicas (massa volúmica e viscosidade) semelhantes às do sangue em canais retos de secção circular com dimensões próximas das veias. A técnica (ótica não intrusiva) de

visualização usada para o desenvolvimento deste estudo foi a velocimetria por imagem de micropartículas (micro-PIV). O equipamento disponível para o desenvolvimento deste estudo experimental foi recentemente adquirido pelo Departamento de Engenharia Química e Biológica do ISEC, no âmbito do Programa Mais Centro (Programa Operacional do Centro). Pelo facto de se tratar de uma técnica de execução complexa, e de não existir trabalho realizado com este equipamento específico, foi necessário um período inicial de familiarização com o equipamento e técnica de micro-PIV, assim como, com o respetivo *software* de tratamento de imagens (*DynamicStudio*). Em seguida, foi necessário proceder à otimização das condições de operação a usar nas medições de velocidade e também desenvolver uma metodologia eficaz para o tratamento das imagens obtidas. Este estudo preliminar foi realizado utilizando um microcanal em acrílico cedido pelo fornecedor do equipamento de micro-PIV, a *Dantec Dynamics*.

Concluída esta fase, o objetivo da aplicação desta técnica na área da medicina e, em particular, ao estudo da hemodinâmica passou a ser possível, simulando o escoamento do sangue nas veias e artérias em microcanais. Para isso, utilizou-se um canal reto feito em polidimetilsiloxano (PDMS), onde se estudou o escoamento de uma solução com propriedades reológicas semelhantes ao sangue e que simultaneamente apresentava um índice de refração igual ao do material do canal. A constatação de que a qualidade dos resultados obtidos dependia da semelhança do índice de refração do fluido usado e do material de que é feito o canal onde ocorre o escoamento, fez com que este aspeto constituísse um objeto de estudo adicional neste trabalho.

## **2. Introdução**

A hemodinâmica é um ramo da mecânica de fluidos onde são aplicados estes conceitos ao estudo do escoamento do sangue no sistema circulatório. Neste capítulo será apresentada uma breve descrição do funcionamento do sistema circulatório, seguindo-se uma curta referência à temática da mecânica de fluidos necessária para a compreensão da hemodinâmica. Por fim, serão apresentadas algumas técnicas de visualização de escoamentos de fluidos, sendo dado particular relevo às técnicas óticas não intrusivas que englobam a velocimetria por imagem de partículas ou micropartículas.




### **2.1. Sistema circulatório**

O sistema circulatório é constituído por uma vasta rede de vasos sanguíneos de vários calibres por onde escoam o sangue que irriga todo o organismo. Este é responsável pelo transporte de nutrientes e oxigénio a todas as células, assim como pela remoção das substâncias resultantes do seu metabolismo que são por elas excretadas. Existem três tipos de vasos sanguíneos fundamentais no sistema circulatório: as artérias, as veias e os capilares. Na Tabela 1 encontra-se uma ilustração de cada um deles, acompanhada de uma breve descrição da sua função.

O sangue circula pelos vasos do sistema circulatório impulsionado pelo coração, que atua como uma bomba, descarregando o sangue para as artérias e recebendo o que chega pelas veias. A rede de vasos sanguíneos é de tal forma arborizada, que é possível afirmar que todas as células do corpo estão próximas de um capilar sanguíneo (Garcia, et al., 2012).



**Tabela 1 - Principais vasos sanguíneos existentes no sistema circulatório e respetivas funções (Cidre, 2008).**

	<p>As artérias conduzem o sangue do coração para todos os órgãos do corpo. Têm paredes grossas, musculares e elásticas para suportar a pressão do sangue acabado de bombear pelo coração.</p>
	<p>As veias conduzem o sangue de volta ao coração. As suas paredes são finas e elásticas e possuem válvulas para impedir o refluxo de sangue.</p>
	<p>Os capilares são vasos microscópicos que fazem a ligação entre as artérias e as veias. Têm paredes muito finas e permeáveis, por onde é realizada a troca de gases e nutrientes.</p>

O sangue revela-se fundamental no que diz respeito à manutenção da homeostasia, isto é, o estado natural de equilíbrio do corpo. Por isso, a sua análise através de métodos laboratoriais pode fornecer dados para o diagnóstico de várias patologias.

O sangue é uma substância coloidal onde, após centrifugação, torna-se possível distinguir uma porção líquida (46 a 63%) e outra sólida (37 a 54%), observável na Figura 1. A porção líquida é denominada de plasma, apresenta uma cor amarelada e é pouco viscosa. O plasma é constituído por água (90%) e outras substâncias (10%) como sódio, potássio, proteínas, colesterol e vitaminas. A porção sólida é de cor vermelha e é constituída pelos elementos celulares do sangue: plaquetas e glóbulos brancos (0,1%) e glóbulos vermelhos (99,9%) (Garcia, et al., 2012; Rampling, 2007; Rudmann, 2005).



**Figura 1 - Aspeto visual do sangue antes e após centrifugação (tubo da esquerda e da direita, respetivamente) (Rudmann, 2005).**

Apesar de nas últimas décadas ter havido um decréscimo significativo na mortalidade devido a doenças do aparelho circulatório na população portuguesa, estas ainda se encontram dentro das principais causas de morte, tal como se observa na Figura 2.

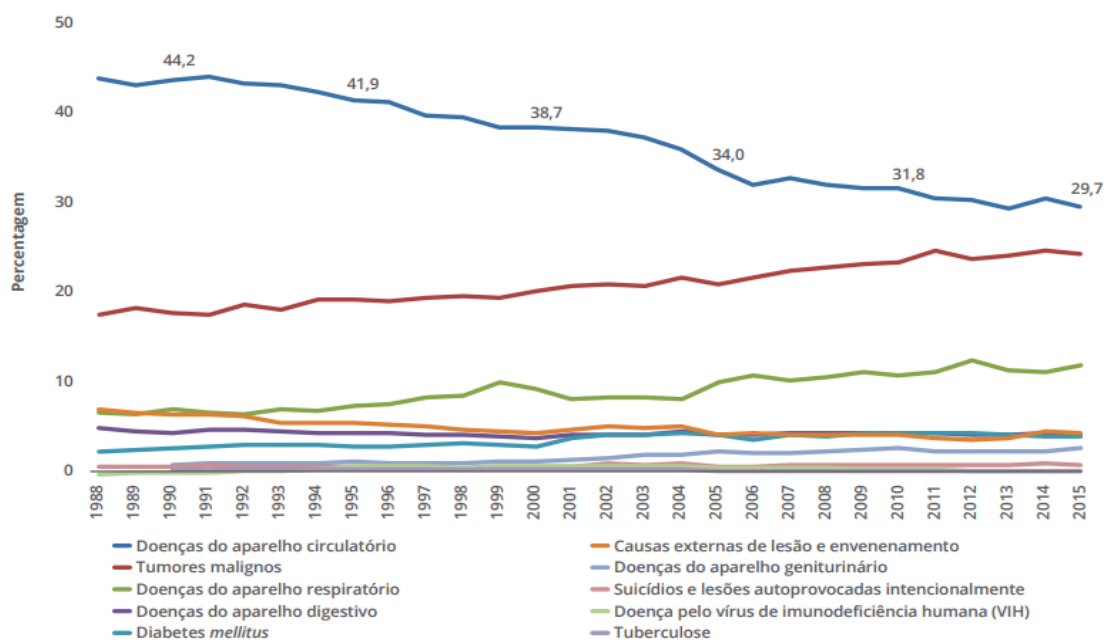


Figura 2 - Evolução da proporção de óbitos pelas principais causas de morte no total das causas de morte em Portugal (%) (1988-2015) (DGS, 2017).

Dentro das denominadas doenças do aparelho circulatório, existem várias patologias que contribuem para a taxa de mortalidade, observada na Figura 2, entre elas, a doença cardíaca reumática, a hipertensão arterial, a doença coronária. A Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE) refere que as doenças cardiovasculares são a principal causa de morte na União Europeia, representando cerca de 36% das mortes ocorridas em 2010. Dentro destas, a doença coronária é a que detém maior percentagem de incidência, sendo responsável por cerca de 40% das mortes no género masculino e 49% no feminino (Figura 3).

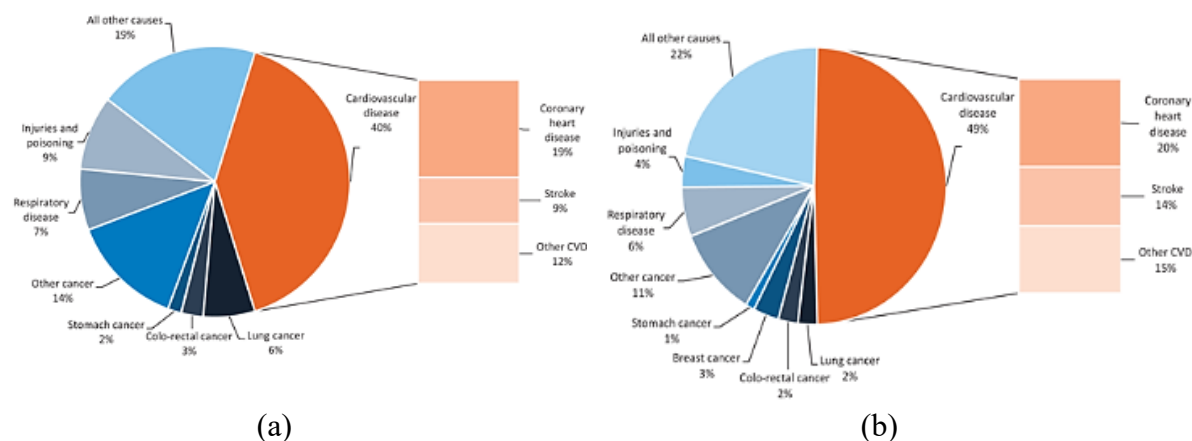


Figura 3 - Proporção de óbitos devido às principais causas de morte na Europa, durante o ano de 2015, no género (a) masculino e (b) feminino (Townsend, et al., 2016).

As artérias coronárias, localizadas na superfície do coração, são responsáveis por fornecer sangue ao músculo cardíaco, o miocárdio. A doença coronária é caracterizada pela diminuição da área seccional das artérias, devido à acumulação de gorduras, ou outras substâncias formam-se placas nas suas paredes, provocando a diminuição do fornecimento de sangue ao coração. Estas placas podem originar a formação de coágulos sanguíneos, que impedem parcial ou totalmente a passagem do sangue, provocando trombooses ou ataques cardíacos. A diminuição do fornecimento de oxigénio e de nutrientes, causada por estas alterações degenerativas, leva

igualmente à redução do desempenho cardíaco (Ballesteros, et al., 2008; Cavalcanti, et al., 1955).

A aterosclerose é a causa primária da doença coronária, caracterizada por uma diminuição anormal no diâmetro da artéria coronária. As lesões ateroscleróticas ocorrem em regiões específicas da rede vascular, particularmente em regiões que apresentam uma geometria complexa, como bifurcações e curvaturas (Loukas, et al., 2009; Ballesteros, et al., 2008). Na Figura 4 encontra-se uma ilustração das artérias coronárias de um indivíduo saudável.

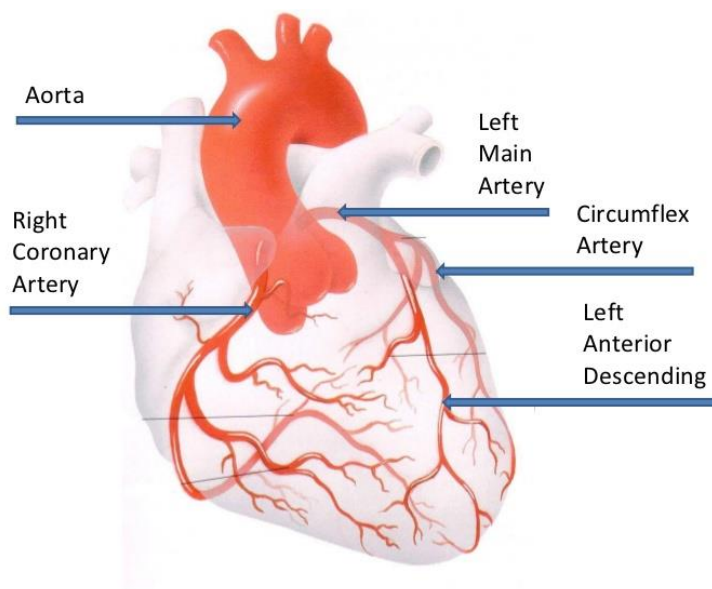


Figura 4 - Ilustração das artérias coronárias (Loukas, et al., 2009).

A formação de uma placa no interior de um vaso sanguíneo, causando uma obstrução parcial ao escoamento do sangue, denomina-se por estenose. A aterosclerose é uma inflamação crônica complexa que afeta artérias de médio e largo calibre e que é frequentemente associada à hiperlipidemia (elevado valor de lipídios no sangue) e outros fatores de risco, como hábitos tabágicos, hipertensão, diabetes, infecções crônicas e predisposições genéticas (Chatzizisis, et al., 2007; VanderLaan, et al., 2004). O mecanismo de desenvolvimento da aterosclerose é complexo e a sua localização depende de muitos fatores associados ao escoamento do sangue.

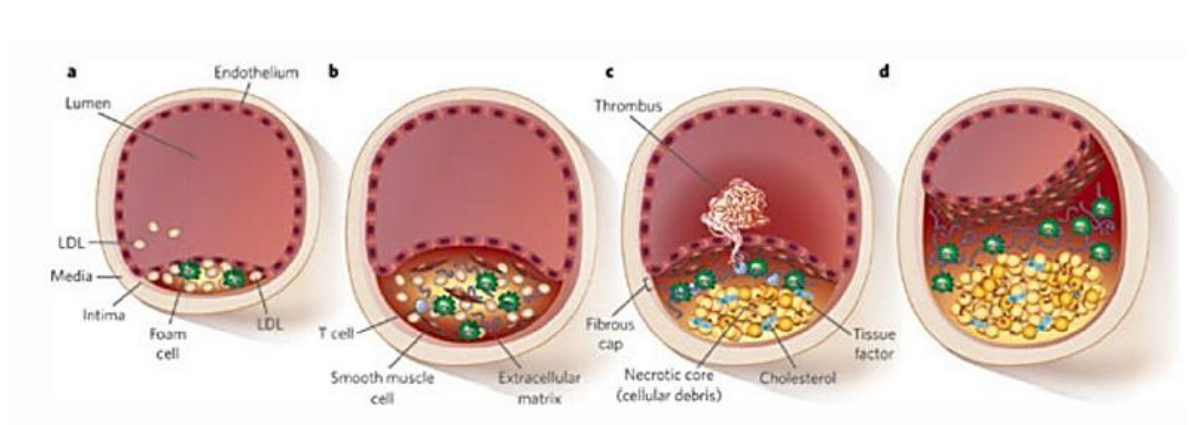


Figura 5 - Estágios de progressão da aterosclerose: (a) início da lesão; (b) lesão intermédia; (c) lesão vulnerável à ruptura; (d) lesão avançada obstrutiva (Costa, 2016).

A Figura 5 ilustra a progressão da aterosclerose em quatro estágios principais: o primeiro no início da doença (Figura 5 a), quando lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e outras

moléculas entram na parede da artéria e formam estrias lipídicas, conhecido como sendo o primeiro sinal de aterosclerose. Quando a gordura se deposita, dá-se a formação de uma placa na parede da artéria, denominada de placa aterosclerótica, que afeta o escoamento do sangue (Figura 5 b). Esta placa pode continuar a desenvolver-se sem obstruir totalmente a circulação do sangue mas torna-se suscetível à rutura (Figura 5 c), resultando na exposição de material trombogénico para o interior da artéria originando a formação de trombos (coágulos). Finalmente, se a placa aterosclerótica não sofrer rutura e a inflamação continuar a desenvolver-se, o diâmetro da artéria diminui progressivamente, restringindo o escoamento do sangue (Figura 5d) (Rade , et al., 2008).

As artérias coronárias esquerda e direita, juntamente com a artéria circunflexa e a descendente anterior, são os vasos sanguíneos que podem ser afetados pela doença coronária. A morfologia destas artérias é essencial para entender a localização e desenvolvimento da aterosclerose. Na Tabela 2 encontra-se o diâmetro das artérias coronárias esquerda e direita.

**Tabela 2 - Dimensões típicas das artérias coronárias esquerda e direita.**

Artéria coronária esquerda	Diâmetro (mm)
Tronco comum	3,0
Descendente anterior	2,0
Artéria circunflexa	1,5 (Chaichana, et al., 2011)
Artéria coronária direita	1,94 (Anastasiou, et al., 2012)

A morfologia das artérias pode variar consoante o paciente em questão, o que leva a que exista bibliografia que apresenta valores para o diâmetro das artérias diferentes dos apresentados na Tabela 2, que serviram de referência neste trabalho (MacAlpin, et al., 1973; Fox, et al., 1973; Kalpana, 2003; Ballesteros, et al., 2008; Reig, et al., 2004; Dombe, et al., 2012).

A prevalência de patologias como a doença coronária tem sido responsável pelo desenvolvimento de estudos nesta área, tendo como objetivo o entendimento da doença e assim garantir a possibilidade de atuar no sentido da sua prevenção.

O sangue proveniente da aorta chega às artérias coronárias com um caudal de 250 mL/min, onde cerca de 70% (175 mL/min) é distribuído para a artéria coronária esquerda (Ramanathan, et al., 2005). Neste trabalho vai ser estudado o escoamento de um fluido com propriedades reológicas semelhantes ao sangue (solução aquosa de DMSO a 52% (w/w)) num canal com dimensões próximas do tronco comum da artéria coronária esquerda.

## **2.2. Algumas noções de mecânica de fluidos**

O escoamento de um fluido no interior de um tubo evidencia características distintas, dependendo da grandeza do seu caudal volumétrico. Por essa razão, o volume de sangue que passa num determinado vaso sanguíneo por unidade de tempo e eventuais alterações na área aberta ao escoamento devido ao depósito de substâncias gordas na parede dos canais (obstrução designada por estenose) condicionam o seu padrão de escoamento.

Reynolds Osborne (1842-1912) foi o primeiro cientista a evidenciar as diferenças entre os tipos de regime de escoamento de um fluido ao longo de um tubo (regime laminar e regime turbulento), ao realizar experiências com água. Após trabalho experimental exaustivo verificou que o regime de escoamento de um fluido depende da relação existente entre as forças de inércia e as forças viscosas que atuam no fluido. Esta razão de forças (adimensional) é designada por número de Reynolds (Re), que para o escoamento interno em tubos de secção reta circular é definido como:

$$Re = \frac{\text{Forças inércia}}{\text{Forças viscosas}} = \frac{\rho v D}{\mu} \quad (1)$$

onde  $\rho$  é a massa volúmica do fluido,  $v$  a sua velocidade,  $D$  o diâmetro do canal onde se encontra a escoar o fluido e  $\mu$  a sua viscosidade (Massey, 2002). A grandeza de  $Re$  permite avaliar se existem condições para a existência de um regime laminar ou turbulento já desenvolvido ou se o escoamento se encontra em regime de transição. Para  $Re$  elevados, as forças de inércia são grandes em relação às forças viscosas, pelo que estas não podem evitar as flutuações aleatórias e rápidas do fluido, verificando-se a existência de um padrão de escoamento turbulento. Embora a grandeza de  $Re$  para o regime ser turbulento não esteja bem estabelecida, diversos autores defendem que os seus valores devem ser superiores a 4000. Para números de Reynolds pequenos ou moderados (inferiores a 2000), as forças viscosas são suficientemente elevadas para suprimir as flutuações no escoamento do fluido de forma a mante-lo organizado, e é designado de escoamento laminar.

O número de Reynolds para o escoamento do sangue no sistema de vasos sanguíneos que constituem o sistema circulatório pode variar entre 1, em pequenos capilares, até 4000 na artéria aorta (Ku, 1997). O regime laminar ( $Re < 2000$ ), é descrito por um perfil de velocidades parabólico, o que significa que as porções de sangue mais rápidas encontram-se no centro do vaso sanguíneo e que a velocidade diminui na direção das paredes, isto é, com o aumento da grandeza da direção radial. O regime de escoamento turbulento ( $Re > 4000$ ) acontece quando a velocidade do sangue é muito elevada, sendo que, o transitório ( $2000 < Re < 4000$ ), ocorre quando o escoamento oscila de forma aleatória entre o laminar e o turbulento (Waite, et al., 2007).

A viscosidade de um fluido mede a resistência ao escoamento quando este é sujeito a uma tensão de corte. Considere-se duas placas paralelas separadas por uma fina camada de um fluido de espessura  $l$ , tal como está ilustrado na Figura 2. Mantendo-se a placa inferior fixa e aplicando uma força  $F$  constante na placa superior, esta move-se a uma velocidade  $V$ .

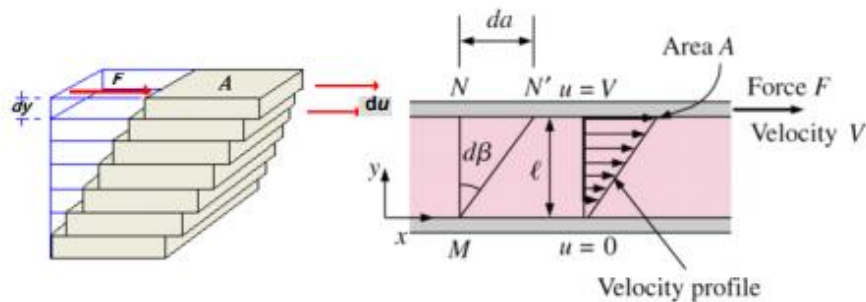


Figura 6 - Escoamento de um fluido entre uma placa fixa e outra móvel onde se ilustra a resistência ao escoamento devido à viscosidade do fluido.

As camadas de fluido adjacentes às placas permanecem em contacto com estas devido às forças de adesão entre o fluido e o sólido. Pela condição de não deslizamento, a camada superior do fluido move-se à velocidade,  $u$ , da placa superior ( $u = V$ ) e a camada inferior de fluido está estagnada ( $u = 0$ ). Após um período transitório, desenvolve-se uma distribuição linear de velocidades, diminuindo a velocidade do fluido desde  $V$  junto à placa de cima ( $y = l$ ), até ser zero junto à placa de baixo ( $y = 0$ ). A tensão de corte (ou tangencial),  $\tau$ , aplicada ao fluido é obtida da razão entre a força  $F$  e a área da placa,  $A$ , e a taxa de deformação resultante é equivalente ao gradiente de velocidade  $du/dy$  (Massey, 2002).

Para a maioria dos fluidos, tal como o ar, água e óleos, a razão entre a tensão de corte e a taxa de deformação é constante e igual à viscosidade dinâmica (ou absoluta) do fluido. Os fluidos com este comportamento são designados por Newtonianos e a sua viscosidade pode ser obtida através de:

$$\mu = \frac{\tau}{\frac{du}{dy}} \quad (2)$$

Quando a tensão de corte aplicada ao fluido não é diretamente à taxa de deformação resultante, o fluido é considerado não-Newtoniano (Massey, 2002).

Tal como foi referido na secção anterior (2.1), o sangue é uma suspensão líquida composta por 37 a 54 % de líquido (plasma) e 46 a 63 % de elementos celulares, apresentando, maioritariamente, um comportamento não-Newtoniano. No entanto, em determinadas condições este pode adotar um comportamento Newtoniano. Isto acontece porque a viscosidade do sangue depende, não só das propriedades do plasma (fluido Newtoniano), como também da percentagem de glóbulos vermelhos, da tensão de corte a que é sujeito e das dimensões do vaso sanguíneo (Rudmann, 2005). Assim, os glóbulos vermelhos determinam a diferença de viscosidade entre o sangue e o plasma. No entanto, a viscosidade do sangue depende da viscosidade do plasma em conjunto com o hematócrito (percentagem do volume de glóbulos vermelhos no sangue) e da deformação dos glóbulos vermelhos.

A Figura 7 representa o comportamento reológico do plasma e do sangue evidenciando a dependência entre a tensão de corte e da taxa de deformação. A viscosidade (aparente) do sangue depende da tensão de corte ( $\tau$ ) aplicada. Para tensões de corte aplicadas sucessivamente maiores, a sua viscosidade diminui, devido à deformação dos glóbulos vermelhos, pelo que este fluido é designado por reofluidificante (Burst, et al., 2013).

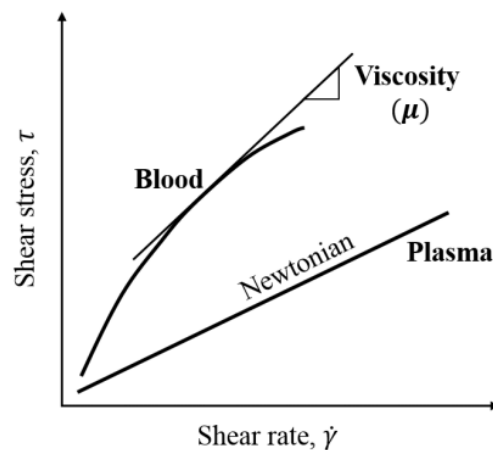


Figura 7 - Comportamento reológico do plasma e do sangue (Costa, 2016).

Estudos *in vivo* demonstraram que o escoamento do sangue em microcanais é fortemente influenciado pelos glóbulos vermelhos pois, para além destes representarem cerca de metade da composição do sangue, são altamente deformáveis (Figura 8), assumindo diversas formas como resposta às variações na hidrodinâmica do sistema circulatório (Lima, et al., 2012; Sousa, et al., 2013).



Figura 8 - Deformação *in vivo* dos glóbulos vermelhos ao longo de um capilar (Minamiyama, 2000).

Nas artérias, onde o diâmetro é significativamente superior às dimensões dos glóbulos vermelhos, é possível considerar que o sangue se comporta como um fluido de uma só fase (homogêneo), ignorando a sua natureza reológica particular. O sangue, proveniente do coração, escoia pelas artérias e é sucessivamente distribuído por vasos sanguíneos com menor diâmetro. Consequentemente, a pressão e a velocidade vão diminuindo e quando o sangue chega aos capilares de menores dimensões, o número de Reynolds é muito reduzido, passando o escoamento a ser dominado pelas forças viscosas. A esta escala, torna-se fundamental tratar o sangue como um fluido de fases múltiplas (coloidal) em escoamento. Em vasos sanguíneos de dimensões inferiores a 300  $\mu\text{m}$ , ocorre um fenómeno que consiste na concentração dos glóbulos vermelhos no centro do vaso e na formação de uma camada de plasma junto às paredes, facilitando o escoamento (Lima, et al., 2012). Este fenómeno é conhecido pelo efeito de Fahraeus-Lindqvist (Fahraeus, et al., 1931).

Nos seus estudos, Fahraeus e Lindqvist observaram que o escoamento do sangue e o valor do hematócrito sofre alterações significativas quando se encontra a escoar em vasos com um diâmetro inferior a 300  $\mu\text{m}$ . Ao fazer escoar o sangue por uma rede de capilares de vidro (com diâmetro < 300  $\mu\text{m}$ ), estes verificaram que o valor de hematócrito registado à saída é menor do que o alimentado, o que sugeria um progressivo decréscimo deste valor com a entrada do sangue em capilares cada vez mais finos. Fahraeus e Lindqvist concluíram que a viscosidade do fluido diminuía à medida que o diâmetro do canal se torna menor (Lima, et al., 2008). Depois destes, vários autores continuaram o estudo da variação da viscosidade do sangue quando escoia em canais com diâmetros superiores a 300  $\mu\text{m}$ , concluindo que, a partir deste, a viscosidade se mantém aproximadamente constante e num valor de 0,003 Pa.s (Koeppen, et al., 2008).

O sangue possui um valor de hematócrito de 45% na grande circulação, que diminui até 20% na microcirculação (Cidre, 2008). Em vasos de pequena dimensão, como os da microcirculação, a viscosidade diminui com a diminuição do diâmetro do vaso, resultado do efeito de Fahraeus-Lindqvist. O comportamento não-Newtoniano mais acentuado do sangue surge na microcirculação, tal como se pode observar na Figura 9.



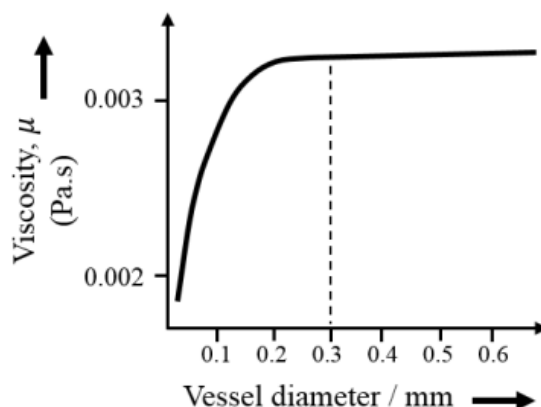


Figura 9 - Variação da viscosidade do sangue com o diâmetro do vaso sanguíneo (Koeppen & Staton, 2008).

### 2.3. Técnicas de caracterização de escoamentos

A caracterização de escoamentos sanguíneos requer uma combinação de métodos *in vivo*, *in vitro* e de estudos numéricos. Os estudos onde são utilizados métodos *in vitro*, são realizados com recurso a modelos que pretendem simular o que se verifica *in vivo*. Esta é uma alternativa exequível e bastante flexível pois permite aplicar técnicas que seriam inviáveis, ou mesmo não-éticas, em estudos *in vivo* (Costa, 2016). O principal objetivo da hemodinâmica é caracterizar, através de métodos computacionais ou de investigação experimental, o escoamento em termos de velocidade e pressão, com precisão. A aplicação de técnicas de visualização é fundamental para a compreensão do comportamento do fluido quando durante o escoamento existem variações quer em termos temporal e/ou espacial, permitindo uma análise quantitativa e qualitativa (Bale-Glickman, et al., 2003).

Existem diversas técnicas que são aplicadas *in vivo* no estudo de escoamentos sanguíneos. Entre estas estão: a tomografia computadorizada, o ultrassom, a ecocardiografia e a ressonância magnética. A tomografia computadorizada é utilizada para a visualização da anatomia das artérias, mas devido à alta radiação envolvida, esta técnica não é viável para estudos prolongados (Rogers, et al., 1980). A ecocardiografia baseia-se em técnicas de ultrassom e é utilizada para obter perfis de velocidade. No entanto, esta técnica requer a utilização de uma janela acústica, o que torna a aquisição de imagens limitada quando passa por ossos ou ar (Taylor, et al., 2004). Dentro destes, a ressonância magnética é a única técnica que permite obter dados anatómicos tridimensionais e perfis de velocidade, sendo por isso a técnica mais utilizada em estudos desta natureza (Fayad, et al., 2001).

Apesar dos estudos *in vivo* serem os ideais (em termos de total reprodução do ambiente fisiológico) e de haver avanços significativos neste sentido, os fatores éticos e práticos continuam a limitar a sua aplicação. Para além disso, são de uma grande complexidade, tornando-se difícil obter medições fiáveis. Isto levou a que vários investigadores começassem por desenvolver estudos em capilares finos com geometrias simples. Estes modelos *in vitro* permitem um maior controlo sobre as variáveis experimentais de interesse e, ainda, a extração de informação detalhada do comportamento do escoamento. Apesar destas experiências (*in vitro*) apresentarem semelhanças com a microcirculação *in vivo*, diferem dos vasos sanguíneos em vários aspetos, como por exemplo, na ausência de elasticidade e na impossibilidade de reproduzir a forma irregular e a assimetria da estrutura da rede sanguínea (Lima, et al., 2012).



A caracterização de escoamentos em estudos *in vitro* é feita, maioritariamente, usando técnicas óticas não intrusivas. Ao longo dos anos, o desenvolvimento destas técnicas permitiu compreender o comportamento do escoamento do sangue no sistema circulatório. As técnicas mais usadas são a microscopia de vídeo e análise de imagens, anemometria de laser-doppler, métodos baseados em velocimetria por imagem de partículas, PIV, ou de micropartículas, micro-PIV, entre outros (Allard, et al., 2009). Na secção seguinte será apresentada uma breve descrição das técnicas existentes para medição e obtenção de perfis de velocidade em fluidos em escoamento, dando-se um maior foco na descrição do modo de funcionamento das técnicas de PIV e de micro-PIV. Tal como referido anteriormente, a técnica de micro-PIV foi a aplicada no presente trabalho para caracterizar o escoamento em microcanais.

A determinação da velocidade local num fluido em escoamento pode ser feita usando diversas técnicas, estando as principais enumeradas na Tabela 3, juntamente com o seu princípio básico de funcionamento.

Tabela 3 - Técnicas de medição de velocidade em escoamento de fluidos (Sengupta, 2007).

Técnica	Princípio de funcionamento
<i>Hot wire anemometry</i>	Medição da velocidade através do calor perdido por convecção pelo fluido. O calor perdido é uma função da velocidade do fluido.
<i>Laser dopler anemometry</i>	Medição da velocidade através da incidência de um feixe de luz no fluido. A diferença do comprimento de onda da radiação é função da velocidade do fluido.
<i>Lorentz force velocimetry</i>	Usado apenas em fluidos condutores. O fluido é exposto a uma força magnética e é medida a força de arrasto. O sinal medido é proporcional à velocidade do fluido.
<i>Particle image velocimetry</i>	São adicionadas partículas traçadoras ao fluido. A medição da velocidade resulta do registo do deslocamento das partículas num dado intervalo de tempo.

O desenvolvimento da técnica de PIV surgiu nos anos 70 e resultou da necessidade de quantificar a velocidade de fluidos de forma instantânea, eficiente e não invasiva. No início da década de 80 já se encontrava praticamente implementada, quando Meynart (1983) demonstrou a sua viabilidade na medição da velocidade em fluidos como a água e o ar. Hoje em dia esta é uma técnica que se encontra completamente desenvolvida e com um grande potencial de aplicação em diversas áreas. O progresso feito num passado recente fez com que seja largamente utilizada em estudos de aerodinâmica. Por sua vez, a técnica de micro-PIV, surgiu como uma derivação da técnica de PIV mas aplicada à microescala, sendo largamente utilizada na indústria aeroespacial, e em estudos aplicados à medicina, nomeadamente na simulação de escoamentos de fluidos biológicos (Raffel, et al., 1998). Na secção que se segue, serão descritos os princípios básicos de funcionamento da técnica de velocimetria por imagem de partículas (PIV).

### 2.3.1. Princípios da técnica PIV

A velocimetria por imagem de partículas é uma técnica ótica para obtenção de perfis de velocidade de escoamentos de fluidos que ocorrem à escala macrométrica. A implementação desta técnica pressupõe a existência de diferentes componentes com funções específicas. Os principais componentes são: um laser de alta potência, cuja função é emitir pulsos de luz, lentes cilíndricas que modelam a luz emitida na forma de feixe (“plano de luz”), uma câmara de alta velocidade (CCD ou CMOS) para captar imagens, uma caixa de sincronização para combinar a ativação de componentes e um computador para adquirir e processar imagens (DANTEC, 2015). Na maioria das aplicações é necessária a adição de partículas traçadoras ao fluido em escoamento. Estas partículas têm de obedecer a critérios específicos como: terem uma massa

volumétrica semelhante à do fluido em escoamento, serem feitas de um material inerte e serem fluorescentes. Ao serem adicionadas ao fluido, estas devem seguir genuinamente o seu escoamento (Raffel, et al., 1998). Uma ilustração dos componentes principais de um sistema de PIV convencional em funcionamento para a determinação de um mapa de vetores num fluido em escoamento está representada na Figura 10.

Para realizar uma medição, o laser é ativado emitindo dois pulsos de luz espaçados de um determinado intervalo de tempo,  $\Delta t$ , tal como está ilustrado na Figura 10. Esta luz passa por uma lente que a transforma num feixe bidimensional, cuja função é iluminar um plano onde se encontra o fluido em escoamento e onde previamente foram adicionadas partículas fluorescentes. A luz que incide nas partículas excita-as, fazendo, por sua vez, com que estas emitam luz que é captada pela câmara de alta velocidade e gravada sob a forma de uma ou duas imagens. A velocidade instantânea é determinada pelo deslocamento percorrido pelas partículas entre os dois pulsos de luz. A aplicação desta técnica pressupõe a aquisição de uma grande quantidade de imagens, o que requer um processamento complexo e sofisticado. As imagens adquiridas são guardadas no computador e posteriormente processadas pelo *software* que aplica um algoritmo de correlação. Para isso, as imagens são divididas em pequenas áreas de análise, denominadas por área de interrogação (AI). Para cada AI, o deslocamento das partículas que se encontram no seu interior (obtido através da diferença de posição  $\Delta x$  de cada partícula entre duas imagens consecutivas, tal como se pode ver na Figura 10) é relacionado com o intervalo de tempo entre as duas imagens adquiridas de forma a calcular-se a velocidade. Após a aplicação de um algoritmo de correlação obtém-se o vetor de velocidade representativo de cada AI (Costa, 2016; Raffel, et al., 1998; Santiago, et al., 1998; Silva, 2005).

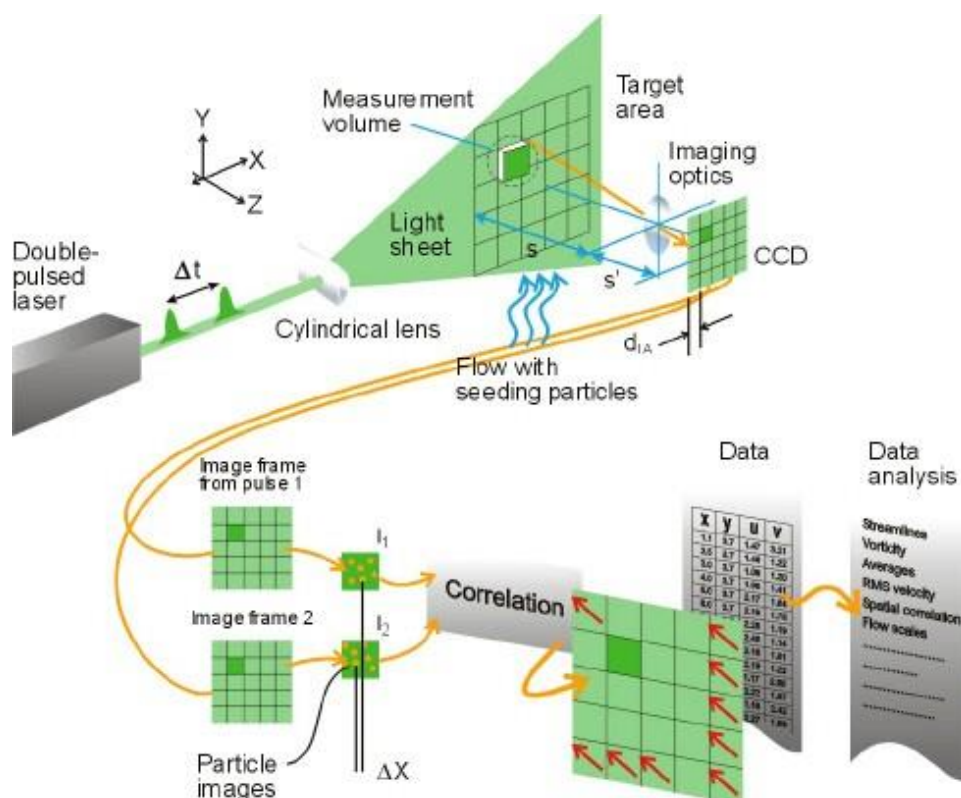


Figura 10 - Equipamento convencional de PIV e ilustração do método de correlação cruzada para tratamento das imagens adquiridas (DANTEC, 2015).

Para obter um campo de velocidade tridimensional, a opção mais simples é adquirir vários perfis de velocidade em planos  $xy$  diferentes (isto é, para diferentes valores de  $z$ ). Uma outra opção mais sofisticada e dispendiosa é acoplar ao sistema uma segunda câmara de alta

velocidade para assim a aquisição dos vetores tridimensionais passar pela captação das imagens do escoamento em dois planos (Silva, 2005; Raffel, et al., 1998).

Nas medições, a sincronização entre o tempo que decorre entre os dois pulsos do laser (denominado tempo entre pulsos) e os dois disparos da câmara para captação de imagens é de extrema importância para que seja garantida a qualidade dos resultados. Para isso, existe uma caixa de sincronização que é responsável por fazer este controlo e garantir a ativação combinada destes dois componentes do sistema. A definição do tempo entre os pulsos do laser depende da velocidade do fluido. O valor definido deve garantir que as partículas no interior de cada AI apresentam um deslocamento de cerca de 25% da dimensão da AI entre os dois pulsos do laser. Geralmente, para um dado diâmetro de canal, o tempo entre pulsos diminui com o aumento da velocidade do fluido em escoamento.

A obtenção do mapa de velocidades do escoamento é conseguida através da aplicação de um algoritmo de correlação (métodos estatísticos) durante o processamento das imagens. A informação recolhida de AI correspondentes em duas imagens consecutivas são correlacionadas através de um algoritmo para determinar os deslocamentos das partículas e fazer corresponder um vetor deslocamento a cada AI. Este vetor resulta da média dos deslocamentos das partículas presentes no interior de cada AI dividida pelo intervalo de tempo que separa a aquisição das duas imagens (definido pelo intervalo entre pulsos). Os vetores de velocidade para todas as AI são obtidos desta forma.

A iluminação é um dos fatores mais relevantes desta técnica pois as partículas são detetadas nas imagens captadas pela câmara através de diferenças na intensidade luminosa do plano da imagem. A iluminação pode ser feita através de um sistema laser (luz pulsada), tal como referido anteriormente, ou através de uma lâmpada ou luz fria (luz contínua). No primeiro caso, como explicado previamente, as partículas traçadoras são excitadas por um feixe laser pulsado a uma dada frequência, emitindo radiação a frequência diferente, que permite registar nas imagens as posições instantâneas de cada partícula em cada pulso de luz. No caso da iluminação contínua, a câmara capta a luz proveniente dos locais onde não há partículas, ou seja, as zonas onde não existe luz correspondem à presença de partículas (Raffel, et al., 1998).

O sistema de luz laser possui a capacidade de produzir luz monocromática com elevada energia que é transformada posteriormente, através de um sistema de lentes óticas, num feixe de luz bidimensional (“plano de luz”). O laser de *Nd:Yttrium Aluminium Garnet (Nd:YAG)* é o mais utilizado, pois apesar de ter uma energia menor do que o de Rubi, possui um comprimento de onda menor (532 nm), o que leva à diminuição da dispersão de luz, logo, produz feixes de luz mais finos e portanto facilita a focagem (Adrian, 1991). A qualidade do sistema de luz laser é essencial para o sucesso das medições. Este tem que ter, obrigatoriamente, uma luz uniforme e os dois feixes produzidos em pulsos consecutivos têm que estar perfeitamente sobrepostos, pois só assim é possível correlacioná-los. Para garantir uma focagem perfeita das partículas, o feixe que ilumina o plano tem que estar posicionado perpendicularmente à câmara de aquisição das imagens. A potência da luz deve ser ajustada de modo a que as partículas sejam iluminadas uniformemente e com intensidade suficiente, mas que não haja uma saturação da câmara por luz excessiva (Silva, 2005).

Como foi mencionado anteriormente, a obtenção dos perfis de velocidade para o escoamento resulta da medição do deslocamento das partículas traçadoras num intervalo de tempo conhecido. Na maioria dos casos, o fluido em estudo não contém partículas suspensas, pelo que estas devem ser adicionadas ao fluido. As partículas podem ser adicionadas continuamente durante a medição ou, então, antes de se dar início ao processo de medição. A escolha do tipo de partículas depende do escoamento em estudo, sendo que é estritamente necessário que não exista interação, quer química, quer física entre as partículas e o fluido. As partículas devem

permanecer no fluido como corpos inertes, não podendo alterar as suas propriedades químicas e devem seguir genuinamente o escoamento. Para isso, devem cumprir a condição de *neutral boyant*, isto é, tenham uma massa volúmica semelhante à do fluido. Estas devem ter uma dimensão reduzida mas suficiente para garantir que a dispersão da luz é eficiente e que sejam detetáveis pelo sistema de imagem (Wereley, et al., 2002).

A concentração das partículas no fluido é também um critério determinante para o sucesso da aplicação da técnica de PIV. Uma concentração demasiado elevada leva a que, nas imagens adquiridas, não se consiga distinguir uma determinada partícula das suas vizinhas devido à elevada emissão de luz, o que comprometerá a qualidade das imagens. Isto não significa que é impossível determinar os vetores de velocidade, mas diminui a exatidão dos resultados. O excesso de partículas poderá ainda fazer com que estas afetem o escoamento do fluido, tornando este método intrusivo (pois há interação das partículas com o fluido). Por outro lado, se a concentração for demasiado baixa, deixa de ser possível determinar a velocidade do fluido em todas as localizações pois não haverá um número de partículas suficiente em todas as localizações. A concentração de partículas ideal no fluido deve ser tal que se garanta a distinção individual de cada partícula. Uma das regras mais importantes desta técnica diz que a concentração de partículas deve ser tal que garanta que estejam presentes cerca de cinco partículas em cada AI (Raffel, et al., 1998; Adrian, 1991; Adrian, 2005).

### **2.3.2. Princípios da técnica de micro-PIV**

A aplicação da técnica PIV a escoamentos à microescala é designada por micro-PIV. Ambas as metodologias têm como objetivo a obtenção de perfis de velocidade em escoamentos através da utilização de uma técnica ótica (não intrusiva) com recurso a uma câmara de alta velocidade. Por essa razão, em geral, a descrição feita na secção anterior para o PIV é comum ao micro-PIV.

Os principais componentes necessários para a implementação da técnica de micro-PIV são: um microscópio invertido com objetivas de alta resolução e filtro prismático; laser de alta potência e uma câmara de alta velocidade (DANTEC, 2015). Na Figura 11 estão representados os componentes principais de um equipamento convencional de micro-PIV, assim como a ilustração da metodologia usada no processamento das imagens adquiridas.

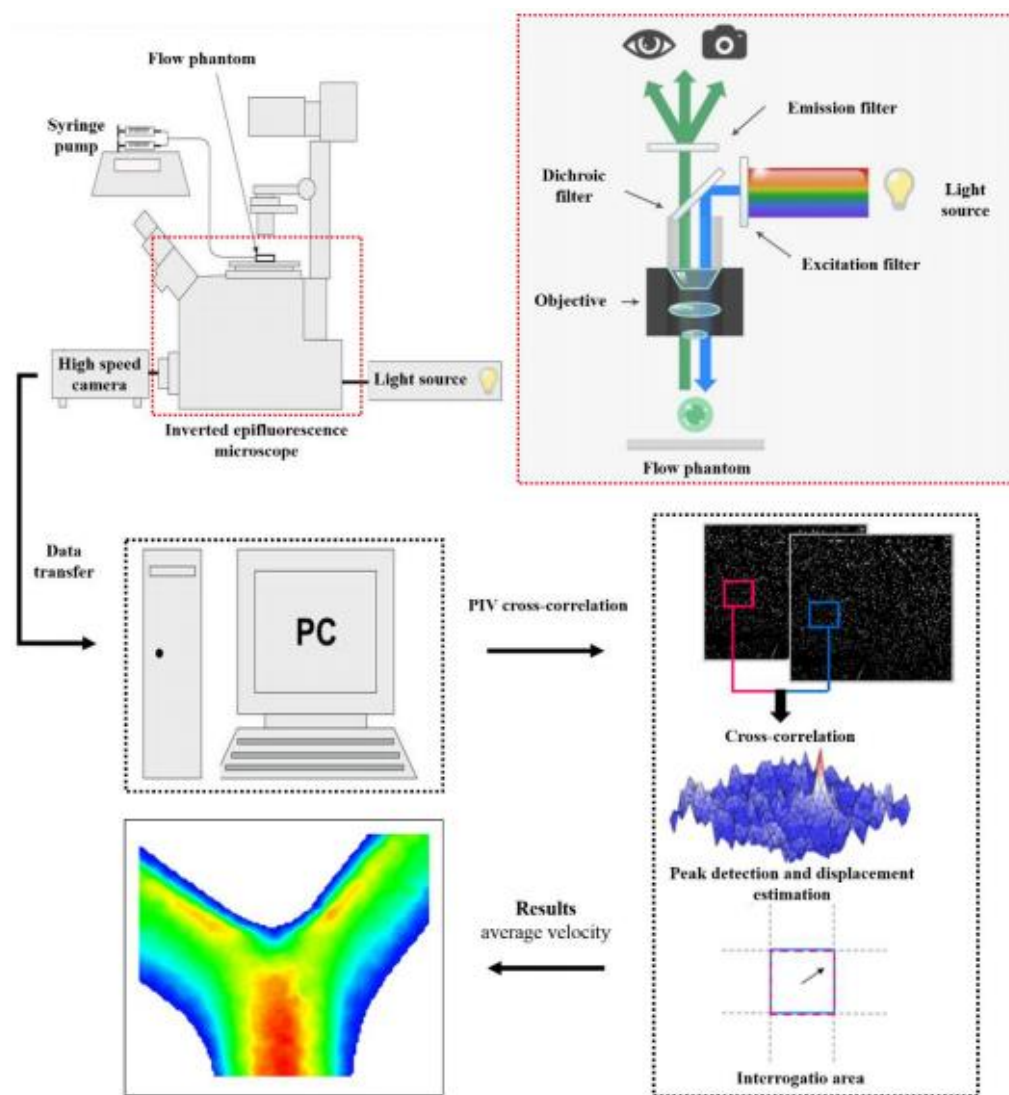


Figura 11 - Equipamento convencional de micro-PIV e ilustração do método de correlação cruzada para tratamento das imagens adquiridas (DANTEC, 2015).

A luz emitida pelo laser é direcionada por uma fibra ótica para o microscópio invertido, onde ao passar por um espelho dicróico é refletida de 90° para ser transmitida através da lente da objetiva e iluminar um volume do fluido em escoamento no microcanal sobre a platina do microscópio (ver Figura 11). A luz emitida pelas partículas fluorescentes adicionadas ao fluido, assim como a luz refletida pelas superfícies do microcanal, retorna ao espelho dicróico, que funciona como um filtro passa-alto (“*high-pass filter*”) transmitindo a luz com comprimento de onda superior a um certo valor,  $\lambda_{\text{filtro}}$ . Assim, a luz do laser é refletida ( $\lambda_{\text{laser}} < \lambda_{\text{filtro}}$ ) e a luz emitida pelas partículas fluorescentes é transmitida pelo filtro, pois  $\lambda_{\text{fluorescência}} > \lambda_{\text{filtro}}$ . Esta luz filtrada é captada pela câmara de alta velocidade e resolução que se encontra acoplada ao microscópio. Usando algoritmos de correlação para detetar e estimar o deslocamento das partículas em imagens consecutivas, é possível obter o mapa de vetores após a determinação dos vetores velocidade correspondentes às diferentes AI que constituem as imagens (Wereley, et al., 2005; Lai, et al., 2004; Raffel, et al., 1998).

Por ser aplicada a medições de velocidade em geometrias com dimensões microscópicas, a técnica de micro-PIV exige equipamento com maior resolução. Há três aspetos fundamentais que diferenciam a técnica de micro-PIV da convencional técnica PIV e que podem acarretar alguns problemas: a iluminação, a luz emitida pelo laser deixa de iluminar um plano para passar a iluminar um volume; as partículas podem ter menor dimensão do que o comprimento de onda

da luz de iluminação; as partículas podem ter uma dimensão tal, que os efeitos do movimento Browniano têm que ser tidos em conta (Wereley, et al., 2002).

De facto, a principal diferença entre as duas técnicas reside na forma como é feita a iluminação do fluido em escoamento. No caso do PIV, a espessura do feixe de luz que ilumina o escoamento é menor do que a espessura focal da câmara (espessura na qual as partículas se encontram focadas na câmara), o que significa que o feixe de luz ilumina apenas as partículas que estão confinadas na espessura focal. Assim, na técnica PIV a iluminação dá-se num plano (iluminação em folha, ver Figura 12) e os níveis de ruído da imagem são mínimos.

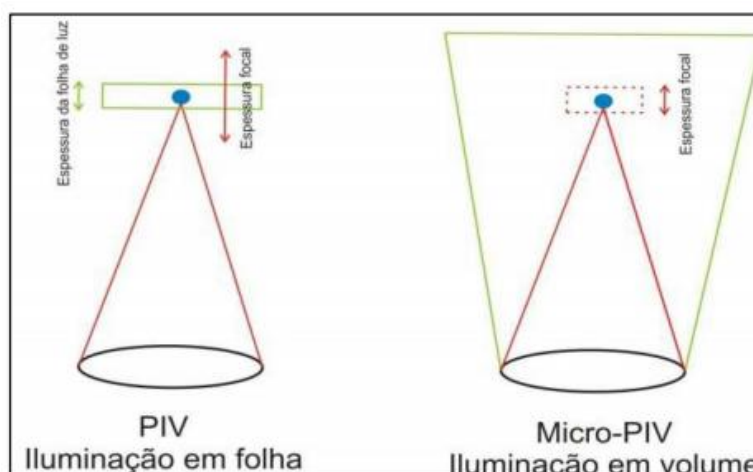


Figura 12 - Diferença entre as técnicas PIV e micro-PIV no modo de iluminação (Costa, 2009).

Por sua vez, na técnica micro-PIV utiliza-se a iluminação por volume, tal como está ilustrado na Figura 12. Agora, os limites de focagem são definidos pela abertura numérica da lente da objetiva (NA) usada, que quantifica a espessura focal da mesma, sendo as dimensões da área de medição definidas pela ampliação da lente da objetiva. Com a iluminação por volume todas as partículas que se encontram no seu interior são iluminadas, independentemente de estarem ou não dentro dos limites de focagem. Este tipo de iluminação constitui um problema, pois as partículas fora dos limites de focagem emitem radiação que introduz ruído, o que é responsável por uma diminuição da qualidade das imagens adquiridas. Este ruído pode ser diminuído com a redução da concentração de partículas usadas. Contudo, os algoritmos de correlação requerem um número mínimo de partículas por AI, tendo de ser encontrada uma solução de compromisso que permita cumprir os requisitos (Lopes, 2012). A Figura 13 ilustra uma imagem adquirida por PIV e por micro-PIV onde é possível observar a diferença entre as imagens adquiridas pelas duas técnicas.

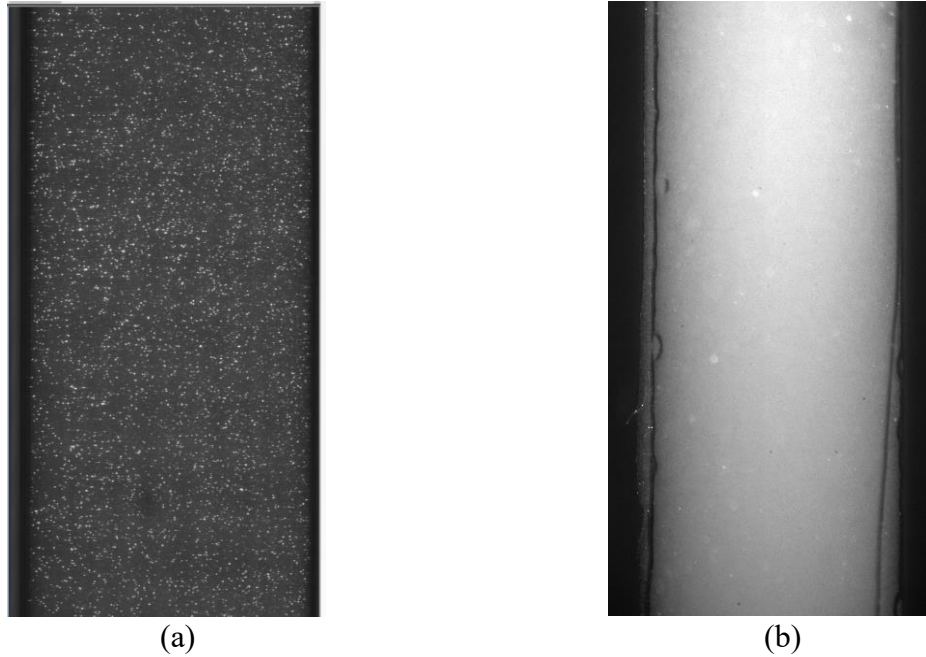


Figura 13 - Imagens adquiridas por: (a) técnica de PIV e (b) técnica de micro-PIV.

Ora, como na técnica de micro-PIV é usada uma iluminação por volume, todas as partículas no seu interior são iluminadas e mesmo as partículas desfocadas podem contribuir para a medição da velocidade. A espessura do plano onde será feita a medição é ditada pela profundidade de campo (ou focal) da objetiva usada no microscópio. Assim, a profundidade focal é um parâmetro de grande importância e caracteriza a contribuição significativa do sinal das partículas que se encontram no volume iluminado, isto é, a contribuição das partículas que se encontram dentro dos limites de focagem (Olsen, et al., 2000; Wereley, et al., 1999). A profundidade focal ( $\delta z$ ) de uma medição é definida como sendo duas vezes a distância entre o plano de focagem e o plano mais próximo onde as partículas já se encontram suficientemente desfocadas para não contribuírem de forma significativa para a intensidade do sinal e pode ser obtida por (Olsen, et al., 2000):

$$\delta z = 2 \left[ \frac{1 - \sqrt{\varepsilon}}{\sqrt{\varepsilon}} \left( \frac{d_p^2}{4NA^2} + \frac{5,95(M+1)^2\lambda^2}{16M^2NA^4} \right) \right]^{\frac{1}{2}} \quad (3)$$

Onde  $d_p$  é o diâmetro das partículas fluorescentes,  $M$  é a ampliação da lente da objetiva e  $\lambda$  o comprimento de onda de fluorescência das partículas. Tipicamente, o valor de *threshold*,  $\varepsilon$ , é cerca de 1% da contribuição máxima das partículas dentro dos limites de focagem.

A dimensão das partículas traçadoras deve ser tal que, ao serem excitadas emitam luz com intensidade suficiente para ser captada pela câmara mas, por outro lado, não devem influenciar o escoamento. O cumprimento destes requisitos pode implicar que o diâmetro das partículas traçadoras seja inferior ao comprimento de onda da luz verde ( $\lambda=532$  nm) incidente e que é emitida pelo laser, o que vai ao encontro do critério da dispersão de Rayleigh. No regime de dispersão de Rayleigh, o diâmetro da partícula,  $d_p$ , é menor do que o comprimento de onda da luz incidente,  $\lambda$ , sendo a quantidade de luz emitida pelas partículas proporcional a  $d_p^{-6}$ . Este fenómeno causa dificuldades na aquisição de imagens, tornando difícil a distinção das partículas nas imagens adquiridas (Wereley, et al., 2002).

Quando a dimensão das partículas traçadoras é demasiado reduzida, o efeito das colisões entre as partículas e as restantes moléculas presentes no fluido é significativo, impedindo-as de seguir



naturalmente o escoamento do fluido. Santiago et al. (1998) no seu estudo discutem o efeito do movimento Browniano na precisão das medições realizadas com micro-PIV e concluem que é menos significativo para escoamentos com velocidades mais elevadas. Mas, quando se efetua uma medição para velocidades maiores, o tempo entre pulsos terá que ser diminuído e, mantendo todas as outras condições fixas, este fator contribui para intensificar o erro introduzido devido ao movimento Browniano.

Na literatura existe um grande número de relatos de investigadores que têm centrado os seus estudos na aplicação da técnica micro-PIV em casos muito específicos na área da medicina, estudando um determinado paciente com uma determinada patologia (Burgmann, et al., 2009; Zelicourt, et al., 2005; Zélicourt, et al., 2005; Costa, 2016). Esta especificidade permite obter resultados experimentais realistas por serem aplicados a uma situação real de um determinado paciente. Para a realização destes testes é necessário proceder à fabricação de um molde do local específico a estudar, com características anatómicas realistas (reconstruído a partir de uma tomografia axial computadorizada, por exemplo), assim como a seleção de um fluido com propriedades semelhantes ao sangue.

A utilização dos moldes visa simular as condições reais do escoamento sanguíneo nas artérias/veias/capilares e com isso tornar possível a obtenção de resultados aplicáveis à realidade. O material mais utilizado para o fabrico destes moldes é o polidimetilsiloxano (PDMS). Este polímero é transparente ao comprimento de onda da luz do laser, tem uma grande durabilidade e apresenta uma superfície estável (química e termicamente) e hidrofóbica, o que o torna adequado para este tipo de aplicações. (Lai, et al., 2004). Os métodos mais comuns usados no fabrico de moldes de microcanais baseiam-se na utilização de um material de sacrifício. Existem vários estudos onde são usados diferentes materiais de sacrifício, tais como: cera (Gailloud, et al., 1999; Wetzel, et al., 2005; Knox, et al., 2005), *cerrolow* (material metálico com baixa temperatura de fusão, de 47°C a 80°C) (Cloutier, et al., 2004; Allard, et al., 2009), isomalte (produto adoçante com temperatura de fusão de 150°C) (Allard, et al., 2009), gesso (Geoghegan, et al., 2012) e caramelo (Jiwon, et al., 2012; Costa, 2016). Os materiais de sacrifício mais utilizados são a cera e o *cerrolow*, sendo que para a sua remoção do molde final é necessário submeter o material a altas temperaturas. Para canais com diâmetro inferior a 2 mm, a cera apresenta muitas limitações, pois é muito frágil e deixa resíduos (Wetzel, et al., 2005). O *cerrolow*, apesar de poder ser usado na obtenção de canais com diferentes diâmetros sem limitação da sua grandeza, deixa resíduos significativos após a sua fusão, o que pode condicionar a qualidade dos resultados finais (Cloutier, et al., 2004; Allard, et al., 2009). O caramelo demonstrou ser o material de sacrifício mais viável para a fabricação de microcanais, aplicável a todos os diâmetros de canais e sem deixar resíduos no molde final (Jiwon, et al., 2012; Costa, 2016).

Como a técnica de micro-PIV é um método ótico, para além de o fluido escolhido para ser usado neste estudo ter que possuir propriedades físicas semelhantes ao sangue, terá que possuir também um índice de refração semelhante ao do PDMS, de forma a eliminar a distorção causada pela curvatura das paredes do canal (Buchmann, et al., 2011). Uma solução de dimetilsulfóxido (DMSO)/água, na proporção de 52% DMSO e 48% água (*w/w*), possui um índice de refração igual ao do PDMS (que é de 1,4125) e, ainda, uma massa volúmica e viscosidade similar à do sangue (Costa, 2016). Este assunto será retomado no capítulo seguinte, onde se fará uma descrição dos materiais e métodos usados no presente trabalho.







### 3. Materiais e métodos

No capítulo que se segue será descrito o equipamento do sistema de micro-PIV utilizado durante o desenvolvimento deste trabalho, assim como algum equipamento auxiliar necessário para promover o escoamento dos fluidos. A calibração do movimento da objetiva do microscópio é também apresentada neste capítulo, pois constituiu uma fase importante que antecedeu a obtenção dos perfis de velocidade para o fluido em escoamento. Será ainda apresentado o procedimento experimental e a posterior metodologia aplicada ao tratamento das imagens adquiridas com vista a obter os mapas de vetores.

#### 3.1. Sistema de micro-PIV

Depois de no capítulo anterior ter sido introduzido o princípio da técnica de micro-PIV e referidos os diferentes componentes que integram um sistema típico, é necessária uma descrição dos componentes que constituem o sistema utilizado neste trabalho. A Figura 14 mostra alguns componentes do sistema de micro-PIV usado, da marca *DantecDynamics*, assim como o equipamento auxiliar para promover o escoamento do fluido através do microcanal colocado sobre a platina.

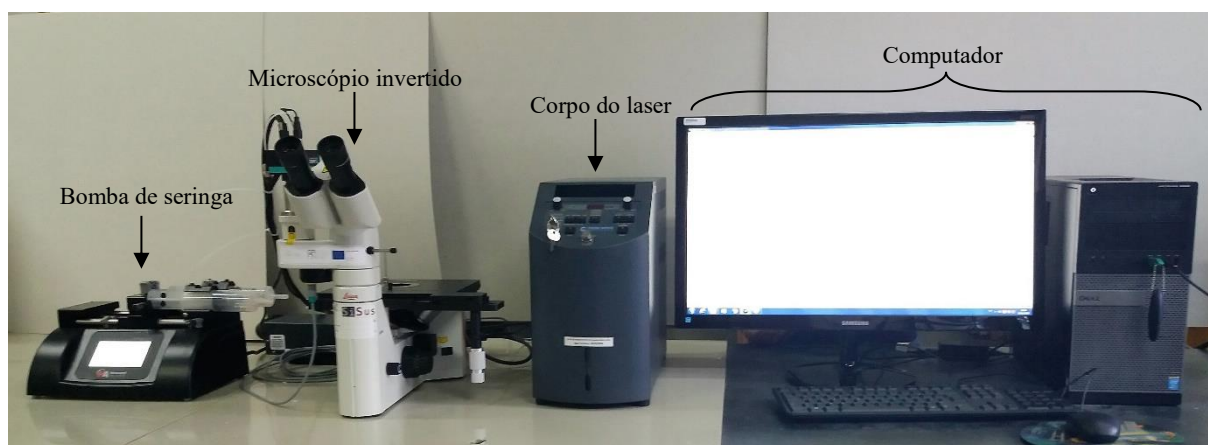


Figura 14 - Sistema de micro-PIV usado no trabalho experimental.

Nas secções seguintes serão apresentadas algumas características importantes dos diferentes componentes do sistema de micro-PIV e equipamento auxiliar, assim como alguns detalhes de funcionamento. Como as partículas fluorescentes são um material essencial para a implementação da técnica usada, a sua caracterização em termos de constituição e fluorescência é também apresentada de seguida, pois este material pode ser visto como um dos componentes do sistema de micro-PIV.

### **3.1.1. Partículas fluorescentes**

As partículas traçadoras fluorescentes utilizadas na realização deste trabalho eram microesferas feitas de poliestireno e revestidas com um polímero hidrófilo contendo ácidos carboxílicos para permitir ligações covalentes com corantes fluorescentes (*Fluospheres® carboxylate-modified microspheres* da *Life Technologies*). A massa volúmica do poliestireno é de  $1050 \text{ kg/m}^3$ . O comprimento de onda de excitação do corante fluorescente usado nas micropartículas, Nile Red (535/575), é de cerca de 535 nm e o comprimento de onda de emissão de 575 nm. As partículas, com um diâmetro de  $1,0 \text{ }\mu\text{m}$ , encontravam-se numa suspensão com 2% de sólidos ( $0,02 \text{ g/mL}$ ). Quando não se encontra em uso, a suspensão deve ser armazenada a  $4^\circ\text{C}$  e protegida da luz. Segundo o fabricante, desde que todas as condições de armazenamento sejam cumpridas, a suspensão manter-se-á estável até um ano após a sua aquisição.

Antes de adicionar as partículas ao fluido a estudar, colocou-se a suspensão num aparelho de ultrassons (da marca *James Products* e modelo 9020 Touch) para promover a eventual desagregação das partículas e garantir que a concentração se mantém homogénea. Ao longo do trabalho prepararam-se várias soluções onde foram adicionadas partículas fluorescentes. Para isso, foi utilizada uma micropipeta onde se pipetou  $0,5 \text{ mL}$  da suspensão de partículas para um volume de  $50 \text{ mL}$  do fluido que se pretendia estudar o escoamento. Tendo em conta que as partículas se encontravam numa suspensão com uma concentração de 1:50 ( $w/v$ ), a concentração de partículas em cada solução foi de aproximadamente 1:5000 ( $v/v$ ).

### **3.1.2. Microscópio invertido e câmara**

A exatidão com que são obtidos os vetores de velocidade depende da qualidade das imagens adquiridas. As imagens foram obtidas com uma câmara CCD (de alta velocidade e resolução) acoplada ao microscópio ótico invertido, que captava as imagens que também são vistas na ocular do microscópio (sem ampliação). Na Figura 15 encontra-se o microscópio invertido utilizado neste trabalho, onde se pode ver a câmara acoplada junto da ocular.

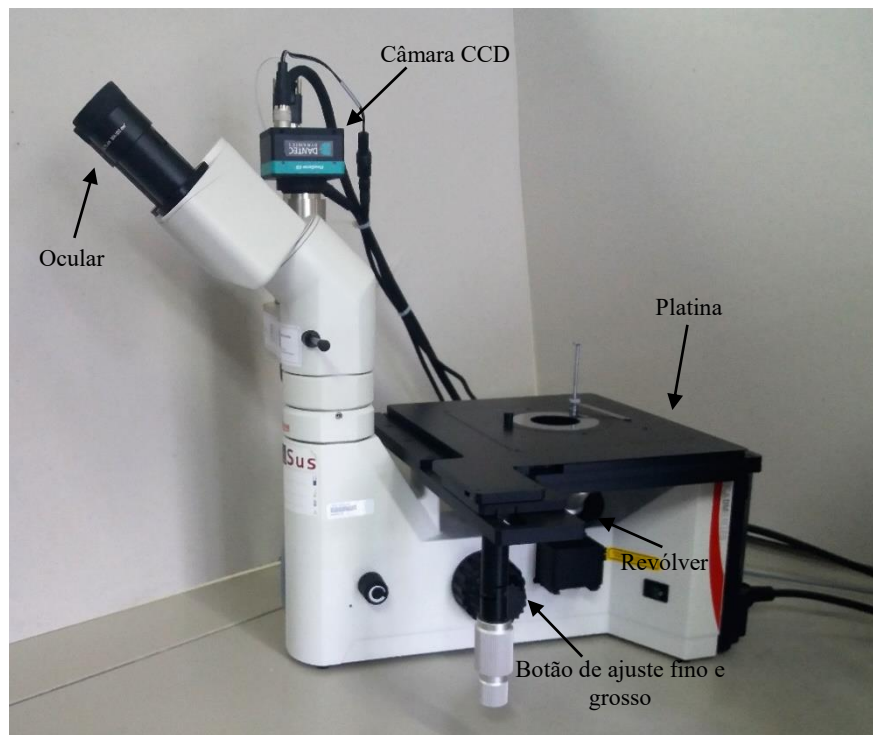


Figura 15 - Microscópio ótico invertido com a câmara acoplada.

A câmara de aquisição de alta velocidade utilizada neste trabalho era uma câmara CCD, modelo FlowSense4M, fornecida pela *Dantec Dynamics*, cujas especificações técnicas mais importantes se encontram representadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Características técnicas da câmara FlowSense4M.

Resolução	2048 pixéis × 2048 pixéis
Dimensões do pixel	7,4 $\mu\text{m}$
Duração do intervalo mínimo entre imagens individualizadas	200 ns

O microscópio utilizado foi otimizado para aplicações em microfluídica, sendo o difusor do laser e o prisma elementos essenciais, tal como é possível observar na Figura 16.

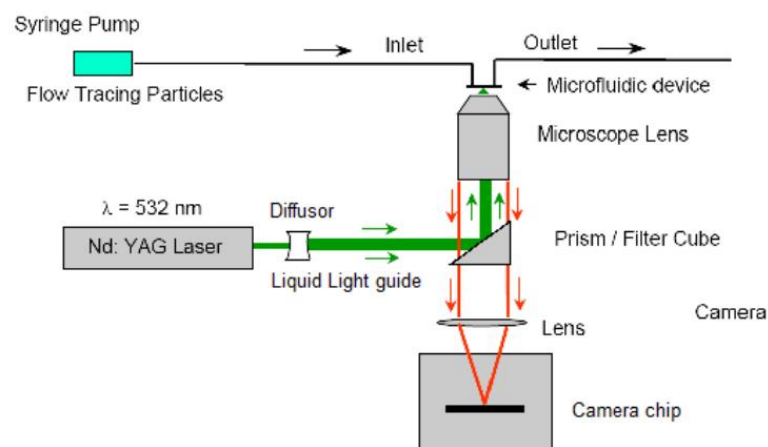


Figura 16 - Modo de operação da técnica de micro-PIV (DANTEC, 2015).

A função do difusor é aumentar o diâmetro do feixe de luz que o atravessa. A luz expandida segue em direção ao prisma onde, ao chegar a este, muda de direção e entra na lente do microscópio. O prisma possui um filtro, cuja função é evitar que a luz fora dos comprimentos de onda de emissão do laser e das partículas traçadoras (532 e 575 nm, respectivamente) seja inadvertidamente transmitida no seu percurso ótico.

O microscópio ótico invertido usado era da marca *Leica*®, modelo DM IL M LED. Como se trata de um modelo invertido, quando é feita a focagem do objeto colocado sobre a platina, através do manuseamento dos botões (de focagem) macrométrico (ajuste grosso) e micrométrico (ajuste fino), o elemento que sofre deslocamento é o revólver onde está localizada a objetiva, ao contrário do que acontece no microscópio convencional (onde é a platina que se move).

Como será discutido no capítulo seguinte, é importante adquirir imagens do fluido no interior do microcanal em vários planos na direção do seu escoamento, para localizar o eixo do microcanal. Assim, é essencial quantificar com rigor o deslocamento da objetiva, pelo que, o primeiro passo dado no sentido da familiarização com o equipamento foi a calibração dos botões macrométrico e micrométrico do microscópio, que se encontra detalhadamente descrita no capítulo 4.

Como foram usados dois dispositivos microfluídicos com dimensões de canal diferentes, durante as experiências foi necessário utilizar objetivas com diferentes ampliações, cujas especificações se podem consultar na Tabela 5.

Tabela 5 - Especificações das objetivas utilizadas.

Objetiva (ampliação)	Abertura numérica (NA)	Distância de trabalho (W.D.) (mm)
N PLAN 2,5X	0,07	11,2
HI PLAN 10X	0,25	12,0

### 3.1.3. Sistema de iluminação

O sistema de iluminação utilizado neste trabalho era constituído por um laser de dupla cavidade de luz pulsada do tipo Nd:YAG da *New Wave Research*®, que se encontra apresentado na Figura 17.



(a)



(b)

Figura 17 - Laser Nd:YAG: (a) corpo do laser; (b) cabeça do laser.

Este é um sistema de alta eficiência criado para utilização específica em aplicações da técnica PIV/micro-PIV. O laser emite uma luz verde de comprimento de onda de 532 nm. O modelo utilizado é o Solo II-15 e na Tabela 6 encontram-se as respectivas especificações técnicas mais importantes.

Tabela 6 - Características do laser.

Taxa de repetição	15 Hz
Energia	30 mJ
Diâmetro do feixe	3 mm
Largura do pulso	3 - 5 ns
Divergência	< 3 mrad
Estabilidade do ponto do feixe	< 100 urad

#### 3.1.4. Sincronização

A sincronização entre os disparos do laser, a aquisição e a transferência de imagens é assegurada por uma caixa de sincronização. O controlo sobre o *hardware* no que respeita aos tempos de sincronização é assegurado pelo *software Dynamic Studio 2015a* da *Dantec Dynamics®* onde são definidos os parâmetros otimizados para as diferentes aplicações em que se pretende obter mapas de vetores. Este *software* dispõe também de diferentes metodologias para processar as imagens adquiridas.

### 3.2. Equipamento auxiliar

Para a determinação do mapa de vetores é necessário promover o escoamento do fluido através do canal com um caudal constante. Para o efeito foi utilizada uma bomba de seringa que impõe um caudal regulável consoante a análise pretendida. O fluido é colocado no interior de uma seringa no suporte da bomba e que se encontra ligada, por meio de um tubo de pequeno diâmetro e flexível, à entrada do canal. A bomba, quando em operação, exerce uma determinada força contínua sobre o êmbolo da seringa, fazendo com que o fluido se desloque e entre em escoamento. Na Figura 18 está representada uma imagem da bomba utilizada neste trabalho.



Figura 18 - Bomba de seringa.

As especificações principais da bomba utilizada neste trabalho, fabricada pela *Harvard Apparatus®*, encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7 - Características da bomba seringa.

Modelo da bomba	PHD ULTRA®
Volume da seringa	0,5 $\mu$ L a 140 mL
Precisão	$\pm 0,05$ %
Caudal	1,5 pL/min a 216 mL/min

Antes de realizar as medições foi efetuada a calibração da bomba de seringa. Nesta calibração foram utilizadas duas seringas, uma de 20 mL (para os caudais menores) e uma de 100 mL (para os caudais mais elevados). Para este fim, encheu-se a seringa com água destilada e impôs-se diferentes caudais na bomba, recolhendo-se o volume numa proveta e anotando o tempo que esta demorou a encher. No Anexo D encontram-se os valores referentes a esta calibração.

### 3.3. Dispositivos microfluídicos e fluidos utilizados

Neste trabalho foi estudado o escoamento de fluidos em dois canais, ambos retos mas de diâmetro e de material constituinte diferente. Na Figura 19 encontram-se imagens dos canais utilizados, onde a cruz, desenhada em cada um deles a cor vermelha, indica a zona onde foram feitas as medições (imediatamente abaixo) e a seta, de cor preta, indica o sentido imposto para o escoamento. Um dos canais foi fornecido pela *Dantec Dynamics* e era feito em acrílico, as dimensões deste canal foram fornecidas pelo fabricante e encontram-se descritas no Anexo B. O outro canal, de maior diâmetro, foi fabricado e usado por Costa (2016) e era de polidimetilsiloxano (PDMS).

No estudo de caracterização do escoamento foram utilizados dois fluidos diferentes: água e uma solução aquosa de dimetil sulfóxido (DMSO) a 52% (w/w), que se revelou ser uma solução com propriedades reológicas semelhantes ao sangue e que simultaneamente apresentava um índice de refração igual ao do material do canal.

Na Tabela 8 encontram-se indicadas as principais características de cada canal, bem como, as propriedades mais importantes dos dois fluidos utilizados.

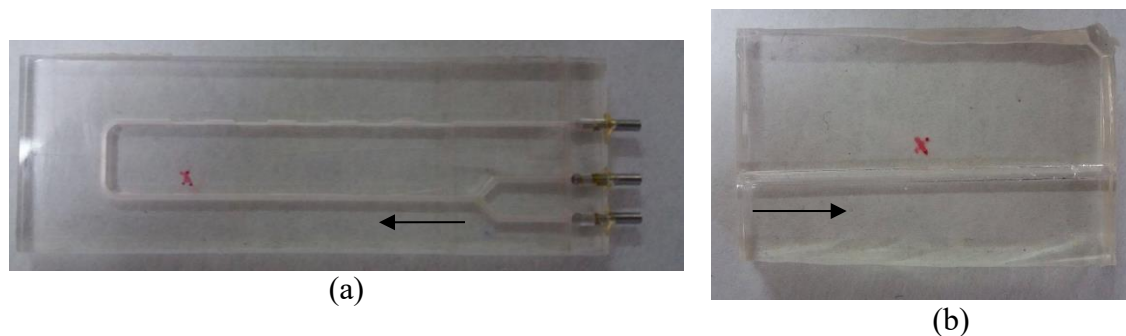


Figura 19 - Canais utilizados: (a) canal de acrílico; (b) canal de PDMS.



Tabela 8 - Características dos dois canais utilizados e dos fluidos a 20°C.

Canais			
	Diâmetro (mm)	Comprimento (mm)	Índice de Refração
Acrílico	0,8	75	1,49 (Bartoli, et al., 1999)
PDMS	2,43 ± 0,02	53	1,4125 (Costa, 2016)
Fluidos			
	Massa volúmica (kg/m <sup>3</sup> )	Viscosidade (Pa.s)	Concentração de partículas traçadoras
Água destilada	998	1,003 × 10 <sup>-3</sup> (Massey, 2002)	1:5000 (v/v)
Solução aquosa de DMSO 52% (w/w)	1057,5	3,08 × 10 <sup>-3</sup> (Costa, 2016)	

As medições foram feitas garantindo um escoamento em regime laminar já desenvolvido para o fluido, pois houve sempre o cuidado de adquirir imagens num local do canal (reto) cuja distância à sua entrada era superior ao comprimento de entrada ( $L$ ) necessário para se obter um padrão de escoamento (laminar) perfeitamente desenvolvido, estimado por:

$$\frac{L}{D} \geq 0,55Re \quad (4)$$

onde  $D$  representa o diâmetro do canal (Massey, 2002).

### 3.4. Procedimento experimental

Antes de dar início à descrição do procedimento experimental, é necessário referir alguns procedimentos prévios de forma a garantir o sucesso da determinação dos perfis de velocidade. Devido à dimensão reduzida das partículas (1 µm de diâmetro), estas têm tendência a aglutinar e a criar um depósito nas paredes do canal e dos tubos de ligação entre a seringa da bomba e a entrada do canal, comprometendo a qualidade dos resultados. Assim, antes de montar o circuito com o dispositivo microfluídico, é importante colocar todo o material no aparelho de ultrassons (durante pelo menos uma hora), incluindo o fluido com as partículas traçadoras a usar. A utilização dos ultrassons tem como objetivo a eventual desagregação das partículas que se encontram na solução e fazer soltar todas as partículas que se encontrem agarradas às paredes do material devido a anteriores utilizações. Para minimizar a ocorrência deste problema durante a realização dos ensaios, é importante que estes sejam realizados ininterruptamente e que não tenham um longo período de duração. Após a sua finalização, é necessário lavar cuidadosamente todo material.

O procedimento experimental da técnica de micro-PIV pode ser dividido em duas fases que serão apresentadas de seguida: a aquisição de imagens e o tratamento das imagens adquiridas.

#### 3.4.1. Aquisição de imagens

Para dar início à fase de aquisição de imagens é necessário montar o circuito com o dispositivo microfluídico onde se realizarão as determinações de velocidade do fluido em escoamento, preparar a seringa com o fluido com as partículas traçadoras na concentração pretendida e colocá-la na bomba. É importante garantir que não existem pequenas bolhas de ar ao longo do circuito. Seguidamente, os parâmetros necessários devem ser ajustados na bomba, nomeadamente o caudal a debitar, e o microcanal deve ser colocado na platina do microscópio, tendo o cuidado de colocar a face onde se encontra a cruz de cor vermelha virada para baixo

(virada para a objetiva). Depois, deve-se proceder ao ajuste da posição da platina do microscópio de forma a que a imagem captada pela câmara contenha a marca em forma de cruz. Nesta altura, estarão reunidas todas as condições para dar início à otimização das condições de aquisição a usar nos ensaios. Para isso, com o *software* em modo de aquisição contínua de imagens manusearam-se os botões do microscópio, primeiro o de ajuste grosso e depois o de ajuste fino, de modo a focar a cruz vermelha desenhada no canal. Este processo teve como objetivo focar a superfície inferior da placa, ou seja, fazer coincidir o plano de focagem da objetiva com a superfície da placa do canal. Uma imagem captada do ecrã do computador nesse momento é apresentada na Figura 20.



**Figura 20 - Focagem da face inferior da placa do microcanal.**

Seguidamente, verificaram-se e ajustaram-se os parâmetros do laser (potência e frequência) que garantissem a aquisição de imagens de boa qualidade.

Na Figura 21 encontra-se uma comparação da aquisição de imagens na qual se operou o laser com a sua potência em modo *Low* e *High*, e onde é facilmente perceptível a melhoria na qualidade de imagem utilizando o segundo modo.

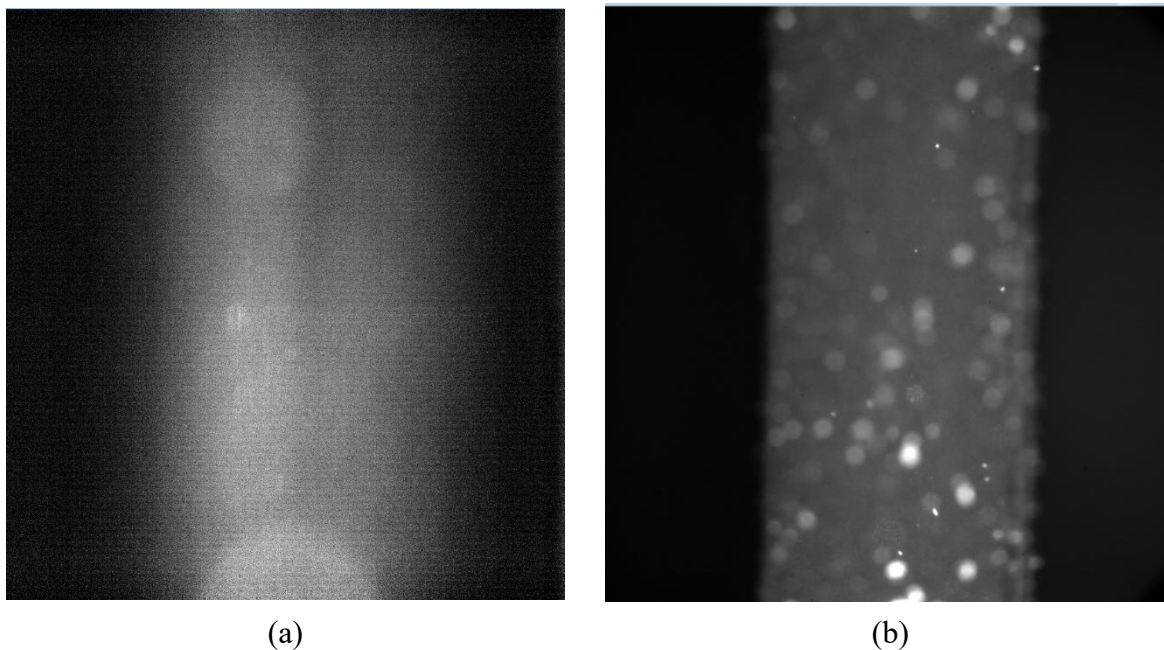


Figura 21 - Ajuste da potência do laser: aquisição de imagens em (a) modo low; (b) modo high.

Depois de definir a potência do laser é aconselhável fazer uma aquisição de imagens para teste, de modo a fazer uma análise prévia da garantia dos requisitos para a obtenção de imagens com qualidade do escoamento a estudar. Este procedimento consistiu na sobreposição de uma grelha com dimensões iguais às da AI que se pretende utilizar no posterior tratamento das imagens ( $32 \times 32$  pixéis), com o objetivo de verificar o cumprimento de uma das condições essenciais à aplicação da técnica: garantir que o deslocamento das partículas entre as duas imagens adquiridas entre pulsos consecutivos do laser é de cerca de 25% da AI. Na Figura 22 é possível observar uma imagem adquirida e, ao lado, a grelha sobreposta sobre esta. Após a colocação da grelha é necessário alternar entre as duas imagens adquiridas de forma a ser perceptível o deslocamento das partículas.

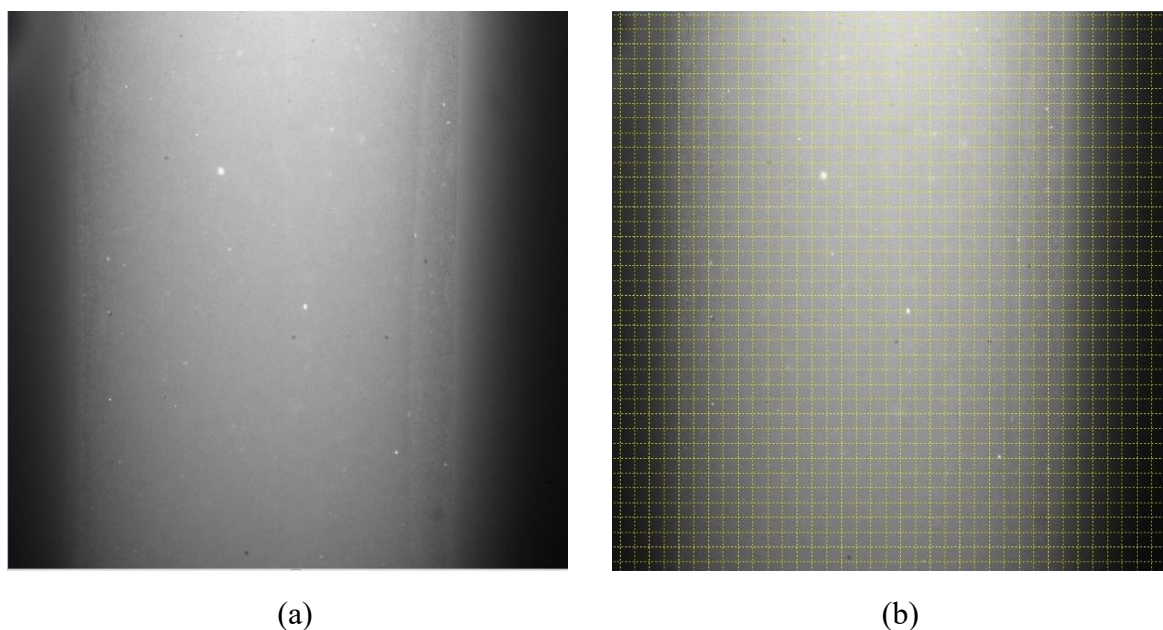


Figura 22 - Ajuste do tempo entre pulsos: (a) imagem adquirida (b) colocação de uma grelha que permite verificar se as partículas se deslocam cerca de 25% da AI.

Este procedimento permitiu aferir da necessidade de ajustar o tempo entre os pulsos do laser a usar nas medições dos mapas de vetores, assim como garantir a existência de cerca de cinco partículas por AI. Após a conclusão destes passos preliminares, deu-se início ao processo de aquisição de imagens para posterior tratamento. Com vista a melhorar a qualidade do sinal adquirido e obter mapas de velocidades com qualidade e que reproduzam o esperado perfil parabólico para regime laminar, estes devem ser obtidos de imagens processadas com médias de cerca de 100 pares de imagens, tal como será discutido em seguida.

### 3.4.2. Tratamento das imagens adquiridas

Na fase seguinte procedeu-se ao processamento das imagens adquiridas. Para isso, começou-se por determinar a média dos 100 pares de imagens adquiridos, usando uma das funcionalidades do *software* (*image mean*). O resultado foi uma imagem que representava o valor médio da intensidade luminosa, intensificando usualmente a luz refletida/emitada por objetos que entre imagens mantêm a posição e intensidade, como por exemplo, as paredes dos canais ou partículas traçadoras agarradas à parede dos canais. Seguidamente, a cada uma das imagens adquiridas foi subtraída a imagem da média, recorrendo a outra funcionalidade do *software* (*image arithmetic*). A Figura 23 mostra o resultado da aplicação desta sequência de tratamento às imagens.

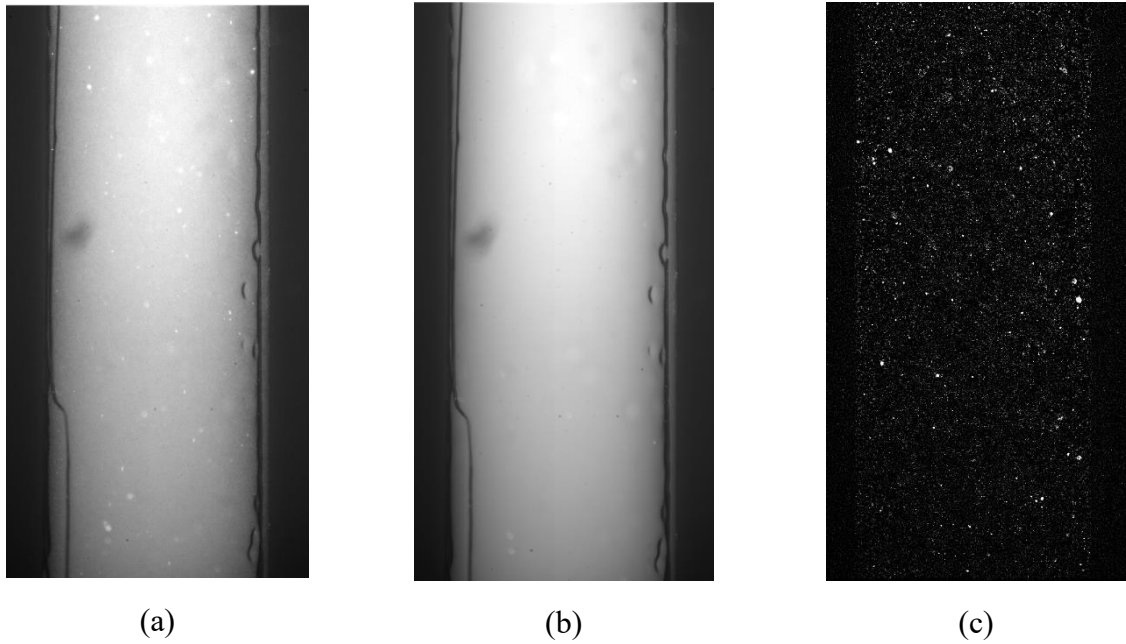


Figura 23 - Sequência do tratamento das imagens: (a) imagem adquirida (b) média dos 100 pares de imagens adquiridos (c) subtração das duas imagens (a e b).

A imagem apresentada na Figura 23 (c) representa a imagem final obtida do tratamento descrito e foi sobre esta que posteriormente se aplicou o algoritmo de correlação, *average correlation*, que permitiu obter um mapa de vetores.

Antes de descrever de forma sucinta a metodologia usada na obtenção dos vetores velocidade é vantajoso para a sua compreensão apresentar uma breve discussão sobre como identificar a mesma partícula registada em pares de imagens consecutivas, para assim calcular o seu deslocamento.

Na Figura 24 a) está ilustrada uma AI com a posição de nove partículas no instante  $t$  (círculos brancos) e com a nova localização das partículas (pelo menos, algumas) passado um intervalo de tempo  $\Delta t$  (círculos cinzentos). Considere-se uma das partículas localizadas na AI no instante  $t$  e determine-se a distância para todas as suas possíveis localizações no instante  $t + \Delta t$  na AI

correspondente. Todos os possíveis deslocamentos dessa partícula, indicados na Figura 24 a) pelos vetores a preto, podem ocorrer com igual probabilidade, tal como está ilustrado no histograma da Figura 24 b), pois a altura dos picos é a mesma. No entanto, só um dos deslocamentos possíveis corresponderá ao efetivamente percorrido pela partícula considerada. Quando o mesmo exercício é feito para todas as partículas nessa AI, somente os deslocamentos relativos às mesmas partículas (indicados na Figura 24 a) pelos vetores a verde) serão coincidentes e, portanto, contribuirão para aumentar o pico correspondente a esse deslocamento que se encontra destacado a verde na Figura 24 c). As outras possibilidades, como não correspondem à mesma partícula, são aleatórias. Note-se que, quatro das nove partículas inicialmente na AI, durante o intervalo  $\Delta t$  saíram da AI considerada e que quatro novas partículas apareceram vindas de AI nas vizinhanças. Esta análise dos histogramas da distância percorrida pelas partículas é equivalente à implementação de uma correlação espacial e permite verificar a qualidade do pico de correlação (ou de deteção), que se pretende que seja bem definido (alto e estreito).

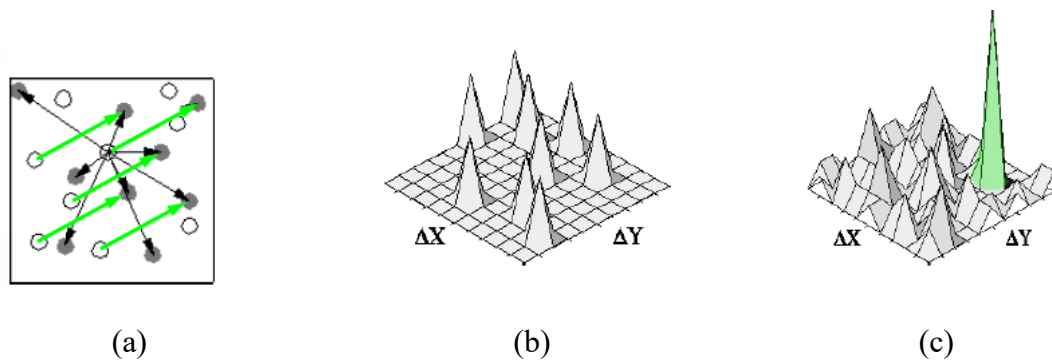


Figura 24 - Processo de identificação das partículas em pares de imagens consecutivos e determinação do respetivo pico de correlação (Kiger, 2005)

A obtenção do mapa de velocidades do escoamento foi conseguida através da aplicação da ferramenta *average correlation* do *software* utilizado para o processamento das imagens, tal como referido anteriormente. A informação recolhida de AI correspondentes em duas imagens consecutivas são correlacionadas através de um algoritmo para determinar os deslocamentos das partículas e fazer corresponder um pico de deteção, tal como foi já discutido. Este procedimento é feito para os 100 pares de imagens disponíveis, sendo, assim, o pico de correlação final obtido sequencialmente e por etapas, pela soma dos valores calculados anteriormente em localizações correspondentes (AI correspondentes) em todos os pares de imagens adquiridos, tal como está ilustrado na Figura 25.

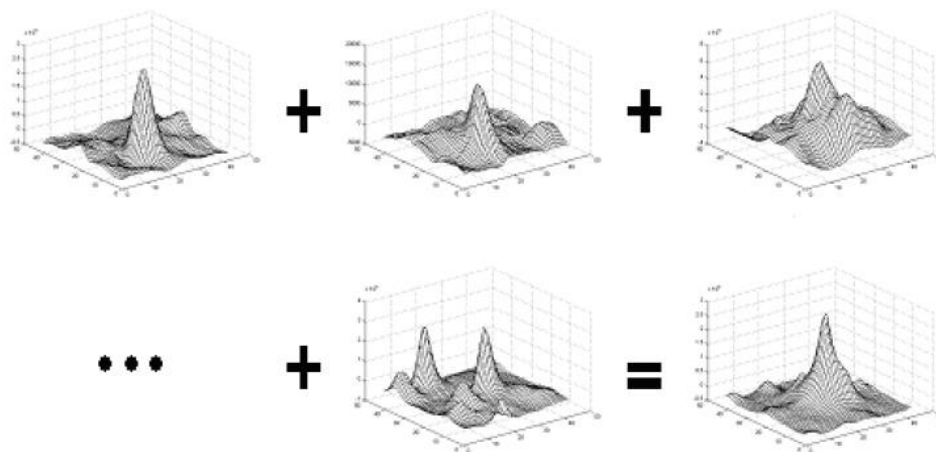


Figura 25 - Obtenção do pico de correlação a partir dos 100 pares de imagens (Dantec Dynamics, 2015).



O valor da função usada para correlacionar os deslocamentos das partículas em cada uma das AI, e para cada par de imagens, é posteriormente adicionado e dividido pelo número de imagens usadas, de forma a determinar um valor médio para a função de correlação e que traduzirá o deslocamento mais provável das partículas para aquela AI (ver Figura 26). O vetor velocidade resulta da razão desse deslocamento pelo intervalo de tempo que separa a aquisição das duas imagens (definido pelo intervalo entre pulsos). Os vetores de velocidade para todas as AI, numa dada imagem, são obtidos desta forma, resultando num mapa de vetores final.

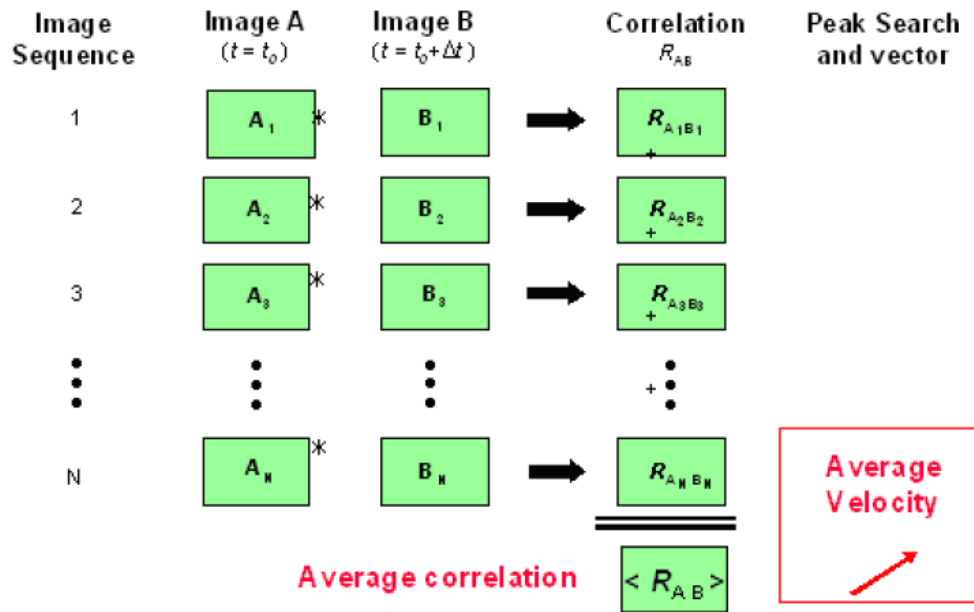


Figura 26 - Obtenção do vetor velocidade utilizando o algoritmo *average correlation* (Dantec Dynamics, 2015).

A ferramenta *average correlation* aumenta significativamente a relação sinal/ruído de forma a gerar um pico de correlação bem pronunciado. Por exemplo, se num dado ensaio tiverem sido adquiridas 100 imagens e nas 90 primeiras não existir nenhuma partícula numa dada região da AI, a média do deslocamento nestas imagens vai ser próxima de zero (apenas vai existir ruído). Se nas últimas 10 imagens adquiridas, houver partículas nesta região, estas vão formar um pico de correlação e este converter-se-á num vetor que traduz a velocidade naquela AI nas 100 imagens adquiridas. Por esta razão, quando se pretende aplicar este método de correlação, é essencial adquirir um elevado número de imagens.

Por fim, se se mostrar necessário, podem ser aplicados filtros aos mapas de vetores de forma a serem eliminados/substituídos vetores anómalos para depois se proceder à extração dos perfis de velocidade para o escoamento em análise.

Para que os perfis de velocidade extraídos traduzam a variação da velocidade de escoamento ao longo do diâmetro do canal que se está a utilizar, é necessário previamente adquirir imagens para calibração das distâncias medidas através das imagens e utilizar a ferramenta *scale factor*. O valor do *scale factor* depende da ampliação da lente da objetiva e a sua função é converter as unidades de pixel, utilizadas pelo software, em unidades métricas. Como inicialmente não é conhecida a localização do centro do canal, para fazer corresponder à distância entre as paredes do canal o valor conhecido do seu diâmetro, é necessário realizar as aquisições de imagens, proceder ao seu tratamento e posterior obtenção do mapa de vetores. Posteriormente, e através da análise dos perfis de velocidade obtidos para vários planos, será possível identificar a localização do centro do canal, pois nessa situação a velocidade no eixo é máxima (mesmo que o seu valor não corresponda à realidade). Após identificar o ensaio cujas imagens adquiridas se situam no centro do canal, estas imagens são copiadas para o local da calibração e servirão para determinar o valor do *scale factor*. Na Figura 27 encontra-se um exemplo da determinação do

*scale factor* numa das experiências realizadas. Para obter o valor do *scale factor* é necessário ajustar os pontos A e B assinalados na Figura 27 a cada um dos limites da parede do canal e indicar qual o valor da distância real entre os dois pontos (*absolute distance*), que corresponde ao diâmetro do canal.

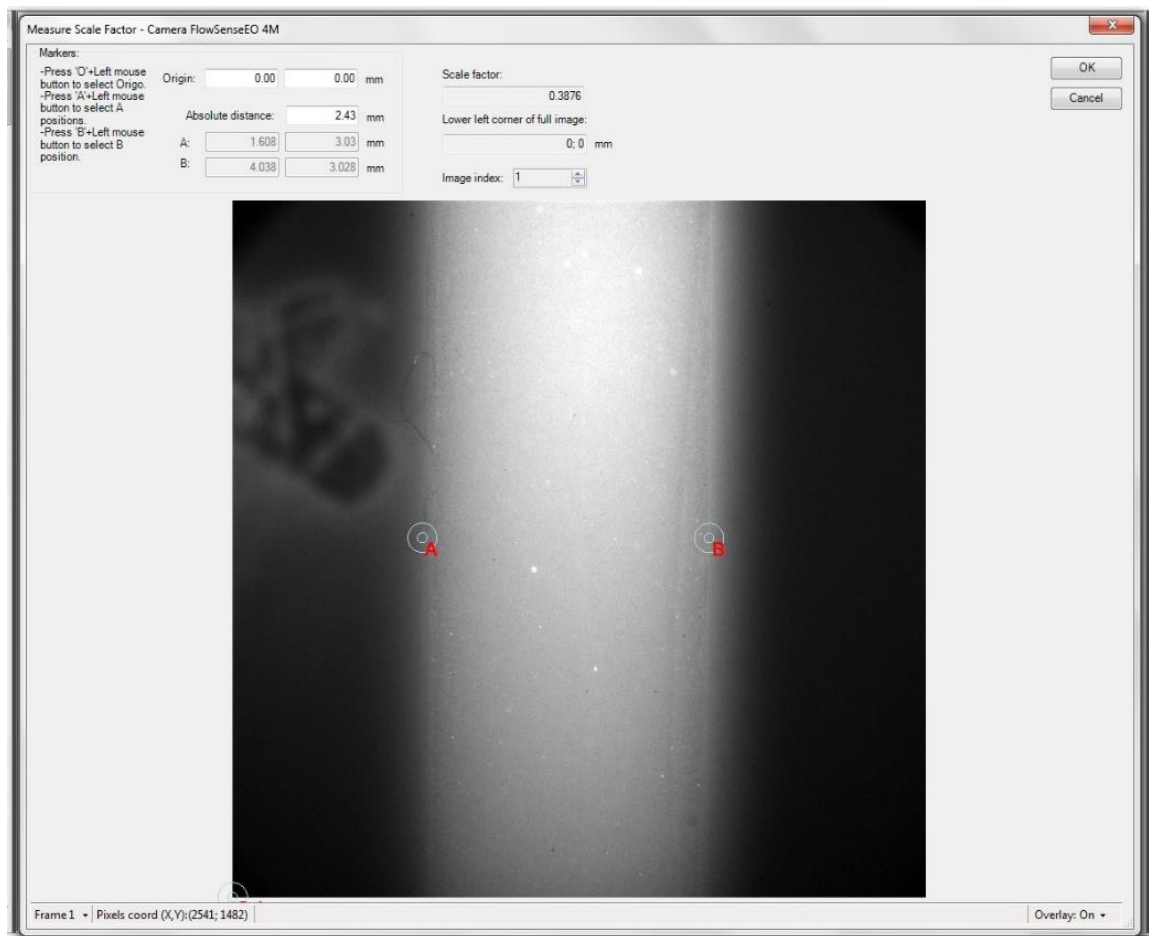


Figura 27 - Determinação do valor de *scale factor*.

A conversão de pixéis para unidades métricas é dada pela Equação (5).

$$\text{Distância (mm)} = \text{Scale Factor} \times \text{Distância (pixéis)} \quad (5)$$





## 4. Resultados e discussão

Tal como foi referido no Capítulo 1, o presente trabalho teve como objetivo a caracterização do escoamento de um fluido com propriedades físicas (massa volúmica e viscosidade) semelhantes à do sangue em canais retos de secção circular com dimensões próximas das veias. A técnica ótica de visualização utilizada foi a técnica de micro-PIV. Pelo facto de se tratar de uma técnica de execução complexa, e de não existir trabalho realizado com este equipamento específico do ISEC, foi necessário um período inicial de familiarização com o equipamento e respetiva técnica, assim como, com o *software* de tratamento de imagens (*DynamicStudio*).

O início do trabalho prático foi marcado por algumas limitações que se deveram à indisponibilidade do material necessário à realização das experiências. O exemplo mais significativo foi a inexistência de uma bomba de seringa, elemento essencial para o controlo do caudal do fluido a usar nas determinações dos perfis de velocidade. Assim, até à chegada da bomba de seringa, o caudal foi imposto e controlado através da diferença de altura do fluido no interior de duas seringas usadas para alimentar e recolher o fluido que circulava através do canal, tal como será descrito mais tarde. Outro fator que se revelou igualmente limitante foi o facto de o microscópio invertido estar apenas equipado com uma objetiva com uma ampliação de 10×. Quando se aplicou a técnica de micro-PIV para obter o padrão de escoamento do fluido no canal de PDMS, verificou-se que a ampliação não era a adequada para as dimensões do canal. A ampliação deveria ser menor, pelo que se procedeu à aquisição de objetivas com menor ampliação, 5× e 2,5×. Durante o período de espera, utilizou-se, como alternativa, um microcanal de acrílico e respetivo *kit* microfluídico que foi cedido pelo fornecedor do equipamento de micro-PIV, a *Dantec Dynamics*, para familiarização com a técnica aquando da aquisição do equipamento. Com este microcanal foram realizados vários ensaios com o objetivo de se otimizarem as condições de operação da técnica e de desenvolver uma metodologia para o tratamento das imagens adquiridas. Quando a bomba de seringa e as objetivas foram entregues e ficaram disponíveis para utilização, deu-se início às determinações de forma a ir ao encontro do objetivo do trabalho: a aplicação da técnica de micro-PIV na área da medicina e, em particular, ao estudo da hemodinâmica. Para isso, utilizou-se o canal em PDMS com a configuração apresentada no capítulo anterior, onde se estudou o escoamento de uma solução com propriedades reológicas semelhantes ao sangue e que simultaneamente apresentava um índice de refração igual ao do material de que era feito o canal.

Como na aplicação da técnica de micro-PIV é essencial quantificar com rigor o deslocamento da objetiva, o primeiro passo dado no sentido da familiarização com o equipamento foi a calibração dos botões macrométrico e micrométrico do microscópio.

#### 4.1. Calibração dos botões do microscópio

No manual do microscópio é dada a informação de que 35 voltas do botão micrométrico correspondem ao deslocamento máximo do revólver (da posição mais baixa à mais elevada), que é de 7 mm. Manuseando o botão macrométrico do microscópio verificou-se que 1 volta do botão equivale a 10 voltas do botão micrométrico. Através desta análise concluiu-se que cada volta do botão micrométrico equivale a um deslocamento de 0,2 mm ( $= 7 \text{ mm}/35$ ) e, sabendo que cada volta corresponde a 100 divisões, cada divisão equivale a 0,002 mm. Para verificar a informação do manual, utilizou-se o canal de acrílico que foi fornecido pelo fabricante do equipamento (apresentado na Figura 19 (a) e cujas características estão indicadas na Tabela 8).

O *kit* para iniciação à técnica do micro-PIV, fornecido pelo fabricante, inclui uma placa em acrílico com um microcanal. Com um paquímetro digital (da marca *Helios* e com uma resolução de 0,01 mm) mediu-se a espessura da placa onde se encontra o microcanal, obtendo-se um valor de 3,05 mm. Seguidamente, desenhou-se uma cruz e um círculo em faces opostas da placa com o intuito de, ao microscópio, focar cada uma delas e saber que estas correspondem ao limite de cada face da placa. Colocou-se a placa com o microcanal na platina do microscópio e selecionando o modo de aquisição contínua no *software Dynamic Studio 2015a* procedeu-se à recolha de imagens. Focou-se a cruz desenhada (que corresponde à face inferior da placa com o microcanal) e rodou-se o botão micrométrico até focar o círculo na face oposta (que corresponde à face superior da placa com o microcanal), ou seja, o revólver movimentou-se no sentido ascendente. Neste processo, para percorrer a espessura da placa (da cruz ao círculo desenhados em faces opostas), contou-se 10 voltas completas do botão micrométrico mais 27 divisões. Sabendo que cada volta corresponde a 0,2 mm e cada divisão a 0,002 mm, a espessura da placa obtida através do sistema ótico será de 2,05 mm. Como o índice de refração do material da placa (acrílico) é diferente do índice de refração do ar é necessário proceder à correção do valor obtido para o deslocamento do revólver, que corresponde à espessura da imagem e não do objeto. Recorrendo à equação de Gauss dos dioptros planos (com um ângulo inferior a  $10^\circ$ ), Equação (6), é possível efetuar a correção desta medição (Guimarães, 2015).

$$\frac{n'}{d} = \frac{n}{d'} \quad (6)$$

Em que  $n'$  e  $n$  representam o índice de refração dos meios de acrílico (Bartoli, et al., 1999) e do ar (Edlén, 1965), respetivamente. A espessura da placa,  $d$ , quando medida com recurso ao microscópio, e por isso, afetada do efeito da refração da luz quando atravessa os dois meios, o ar e o acrílico, corresponde a  $d'$  (espessura da imagem). Depois de corrigir a espessura da imagem da placa, tendo em conta os índices de refração dos dois meios, obtém-se o valor medido com o paquímetro digital, tal como se pode verificar da Equação (7).

$$\frac{1,49}{d} = \frac{1,00}{2,05 \text{ mm}} \Rightarrow d = 3,05 \text{ mm} \quad (7)$$

Assim, o valor de 0,002 mm correspondente a uma divisão do botão micrométrico foi confirmado.

Os botões macrométrico e micrométrico foram também calibrados usando uma outra metodologia que media diretamente o deslocamento do revólver enquanto se manuseava o botão, recorrendo a um comparador. Foram utilizados dois comparadores com resoluções diferentes: um com a indicação do valor do deslocamento até às centésimas do mm (modelo 543-682 da marca Mitutoyo, com uma resolução de 0,01 mm) e outro até às milésimas do mm (modelo ID-C112B da marca Mitutoyo, com uma resolução de 0,002 mm).

O comparador com menor resolução foi o primeiro a ser utilizado. Para a calibração do botão macrométrico, colocou-se o comparador assente no revólver e rodou-se o botão desde a posição mínima (posição do revólver mais baixa e, portanto, mais distante da platina) até à posição máxima (posição do revólver mais elevada e, portanto, mais próxima da platina). O deslocamento medido com o comparador foi de 6,66 mm, enquanto que no manual do microscópio é referido um deslocamento máximo do revólver de 7 mm, tal como referido anteriormente. Na calibração do botão micrométrico, o objetivo seria determinar o valor do deslocamento correspondente a uma volta completa no botão e, consequentemente, o valor de cada divisão (um total de 100 divisões por cada volta). Para isso, posicionou-se o revólver na posição máxima (correspondente a 6,66 mm) e deu-se uma volta completa com o botão micrométrico, lendo-se no comparador o valor 6,47 mm. Repetiu-se o procedimento anterior até alcançar a posição mínima, o que aconteceu após um total de 34 voltas. Para avaliar a existência de histerese, com o botão na posição mínima, rodou-se em sentido contrário repetindo-se o processo anterior até alcançar a posição máxima, onde se leu um valor de 6,50 mm no comparador. Assim, verificou-se a existência de uma diferença de 0,03 mm entre os percursos máximos do revólver quando as medições são efetuadas durante o deslocamento em sentidos contrários. Na Figura 28 encontram-se os valores registados durante o processo de calibração, sendo possível observar que o deslocamento do revólver para uma volta do botão micrométrico se mantém aproximadamente constante durante todo o percurso do revólver. Na Figura 28, os símbolos em forma de círculo correspondem à primeira fase, onde se rodou o botão no sentido descendente, e os quadrados correspondem ao sentido ascendente. Analisando a Figura 28, verifica-se que à medida que se roda o botão micrométrico, o valor do deslocamento do revólver observado por volta está, em geral, compreendido entre 0,19 mm e 0,20 mm, o que está dentro da incerteza do comparador (0,01 mm). No entanto, existe um valor que está notoriamente desviado dos restantes, que corresponde à primeira volta após a inversão do sentido do botão (do sentido ascendente para o sentido descendente), o que parece indicar que o comparador apresenta inércia, pelo que foi ignorado esse valor. A linha a vermelho no gráfico indica a média do percurso para uma volta do botão micrométrico em sentido descendente, cujo valor é de 0,19 mm, e que se verificou ser coincidente com a média dos valores registados em sentido ascendente.

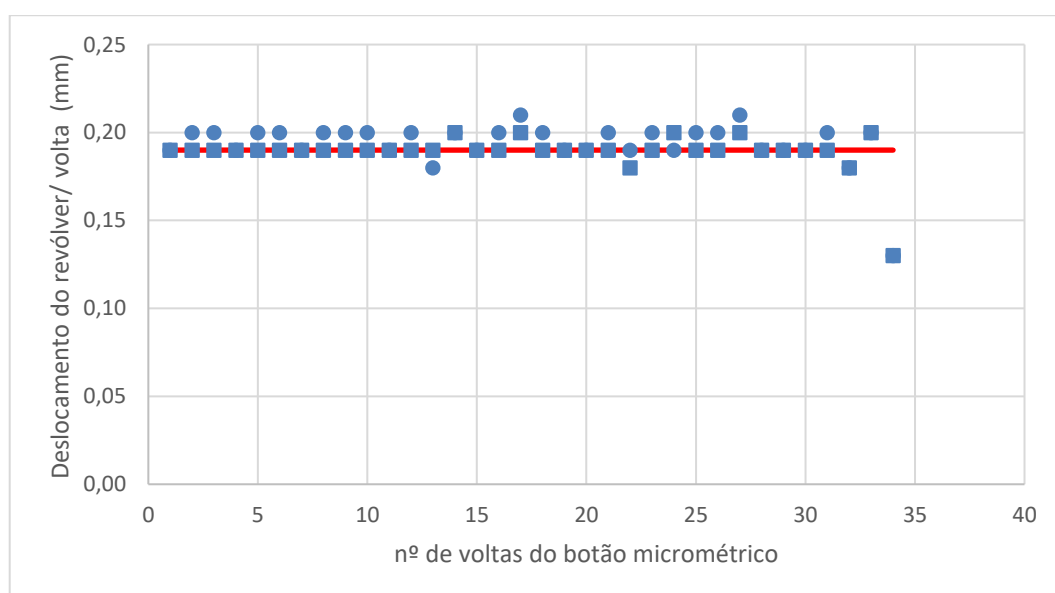


Figura 28 - Deslocamento do revólver (mm), por volta, em função do número de voltas dadas no botão micrométrico do microscópio, usando o comparador de menor resolução (0,01 mm).

Posteriormente, pensou-se que seria vantajoso utilizar um comparador com uma resolução maior (às milésimas do mm), tendo em conta que a mínima divisão do botão micrométrico é de

0,002 mm. O procedimento para a calibração dos botões foi efetuado de igual forma ao descrito anteriormente para o outro comparador. O deslocamento máximo do revólver, medido desde a posição mais baixa do revólver (portanto, mais distante da platina) até à sua posição mais elevada (mais próxima da platina), foi de 6,518 mm, e no sentido inverso, de 6,509 mm. A diferença da distância quando medida em sentidos contrários é de 0,009 mm, pelo que existe uma ligeira histerese. Na Figura 29 encontra-se uma representação semelhante à da Figura 28 para o outro comparador, onde se relaciona o deslocamento do revólver, por volta, com o número de voltas dadas no botão micrométrico. Tal como na Figura 28, também na Figura 29, os símbolos em forma de círculo correspondem à primeira fase, onde o deslocamento foi medido rodando o botão no sentido descendente, e os quadrados correspondem ao sentido ascendente.

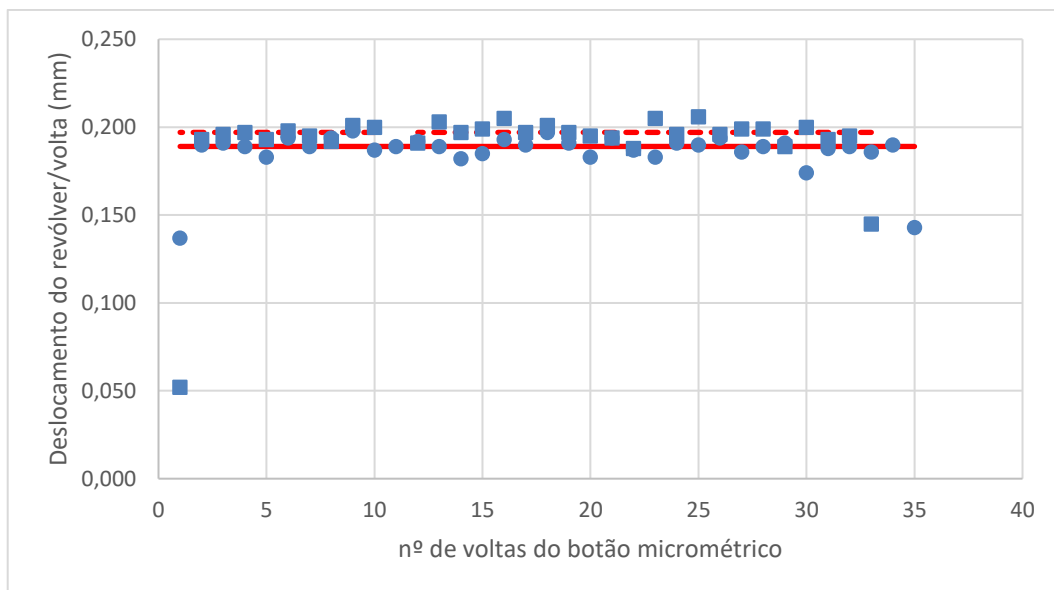


Figura 29 - Deslocamento do revólver (mm), por volta, em função do número de voltas dadas no botão micrométrico do microscópio, usando o comparador com maior resolução (0,002 mm).

Por análise da Figura 29, verifica-se que à medida que se roda o botão micrométrico, o valor do deslocamento do revólver para uma volta está compreendido entre 0,190 mm e 0,200 mm, sendo a amplitude cinco vezes a incerteza do comparador (0,002 mm). No entanto, existem quatro valores que estão notoriamente desviados dos restantes. Dois correspondem à primeira volta das medições em sentido ascendente e após a inversão do sentido do botão, e os outros dois dizem respeito à última volta do botão quando rodado em sentido descendente. Mais uma vez, parece existir inércia no acompanhamento do comparador quando se inicia ou termina uma série de movimentos, sendo neste medidor mais notório do que no utilizado anteriormente que possuía menor precisão. A média dos valores do deslocamento lidos no sentido ascendente foi de 0,189 mm (linha a cheio de cor vermelha no gráfico da Figura 29), e o respetivo valor para o sentido descendente é de 0,197 mm (linha a tracejado de cor vermelha).

O deslocamento médio de 0,2 mm da placa da objetiva indicado pelo manual do microscópio para uma volta do botão micrométrico, a que corresponde um valor médio de 0,002 mm para cada uma das suas 100 divisões, está de acordo com os resultados obtidos das calibrações realizadas com os dois comparadores diferentes. No Anexo A encontram-se os valores de todas as medições efetuadas com os dois comparadores durante a calibração do botão micrométrico.

O objetivo de realizar a calibração dos botões de focagem (o micrométrico e o macrométrico) utilizando um comparador era para que, posteriormente, nas experiências para medição dos perfis de velocidade no fluido em escoamento, este fosse acoplado ao revólver do microscópio e, assim, quantificar o seu deslocamento de forma direta e instantânea. Para além disso, pensou-

se que esta metodologia poderia oferecer a garantia de uma melhor repetibilidade das condições em que os mapas de velocidade iriam ser medidos ao eliminar o erro devido ao olho humano. Após várias tentativas de implementação desta ideia, concluiu-se que o comparador apresentava inércia (como se pode observar na Figura 28 e Figura 29), quando se encontrava numa posição fixa durante algum tempo, pois os valores lidos no indicador do comparador não correspondiam ao deslocamento imposto pelo manuseamento do botão. Por esta razão, foi abandonada a ideia de acoplar um comparador ao revólver do microscópio com as objetivas e assim registar diretamente o seu percurso. O deslocamento do revólver passou a ser imposto pela quantificação do número de voltas e/ou divisões completadas durante a rotação dos botões de focagem.

## **4.2. Canal de acrílico**

A utilização do canal de acrílico para aplicação da técnica de micro-PIV ao estudo do escoamento de um fluido teve duas fases distintas: a primeira, onde se impôs e controlou o caudal do fluido admitido no canal pela diferença de alturas da superfície livre do líquido em duas seringas, e a segunda, onde o caudal passou a ser imposto por uma bomba de seringa.

Como tem vindo a ser referido ao longo da descrição do trabalho, as condições de operação do equipamento são determinantes para a obtenção de imagens com qualidade. Desta forma, a primeira fase do trabalho prático foi determinante para que se otimizassem as condições de aquisição das imagens, e, por sua vez, o tratamento das mesmas. Por essa razão, foram feitas várias tentativas para a obtenção dos perfis de velocidade que se apresentam na secção seguinte (4.2.1). Contudo, os primeiros resultados obtidos não foram satisfatórios e só posteriormente, quando a técnica se encontrava totalmente afinada e os procedimentos que antecederiam as determinações ficaram otimizados, é que se constatou que a possível acumulação de partículas fluorescentes contribuíam para a existência de zonas não uniformes nos mapas de vetores. Ainda assim, achou-se que seria relevante a menção desta fase do trabalho, uma vez que esta contribuiu para impulsionar no bom sentido o trabalho restante.

### **4.2.1. Controlo do caudal pela diferença de altura da superfície livre do fluido em duas seringas**

Tal como foi mencionado no início deste capítulo, na primeira fase do trabalho experimental utilizou-se o canal de acrílico e respetivo *kit* microfluídico que foi cedido pelo fabricante do equipamento de micro-PIV. O caudal de fluido admitido foi controlado através da diferença de altura do fluido no interior de duas seringas, tal como se pode observar na Figura 30. A seringa da direita, colocada a um nível superior, continha o fluido que seria alimentado, através do tubo flexível, ao canal. A seringa da esquerda, colocada a um nível inferior, recolhia o fluido que circulava através do canal. Como o canal de acrílico possuía uma bifurcação perto do local da entrada do fluido, para garantir que não existia divisão da corrente do fluido em circulação foi usada uma terceira seringa (colocada à mesma cota do canal) ligada a um dos ramos da bifurcação através de um tubo flexível preenchido com o fluido em repouso. Desta forma, todo o fluido em circulação seria recolhido na seringa da esquerda. A grandeza do caudal do fluido em escoamento podia ser modificada alterando a diferença de alturas das superfícies livres do fluido entre as duas seringas.

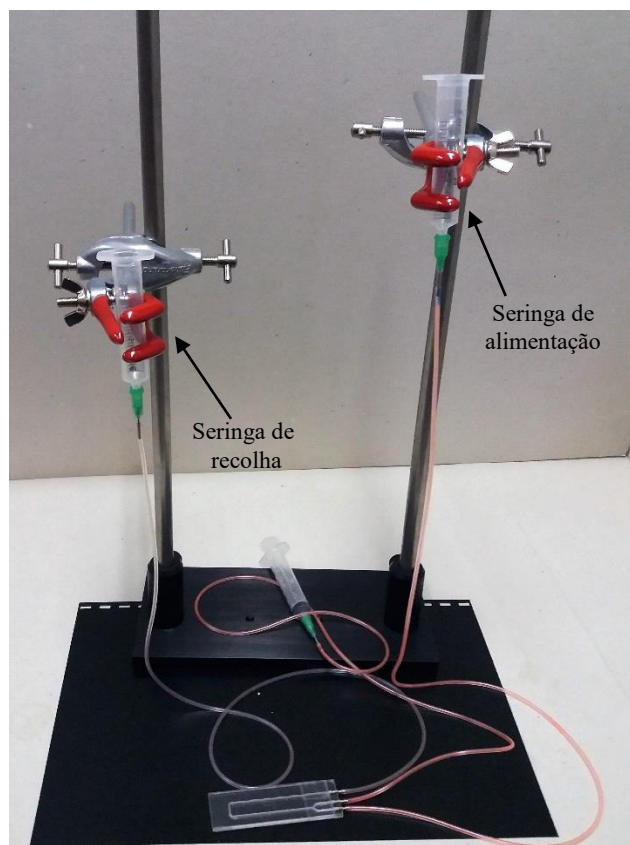


Figura 30 - Kit microfluídico cedido pelo fornecedor do equipamento de micro-PIV.

Durante as experiências realizadas manteve-se a diferença de altura entre a superfície livre do líquido nas duas seringas aproximadamente constante, e igual a 10 cm, de forma a garantir um escoamento permanente. É de referir que durante o tempo necessário para a aquisição das imagens em determinadas condições, a alteração do volume de fluido contido nas duas seringas não é significativo, pelo que é legítimo considerar que o caudal do fluido em escoamento é mantido constante.

O regime laminar ( $Re < 2000$ ), característico deste tipo de geometrias, é descrito por um perfil de velocidades parabólico, onde a velocidade máxima ocorre no centro do canal e vai diminuindo com a direção radial até se anular junto da parede do canal. Para possibilitar a comparação do perfil de velocidades medido com o esperado teoricamente para regime laminar, decidiu-se começar por adquirir imagens junto da localização onde se previa ser o eixo do canal, aplicando a técnica de micro-PIV. Para isso, deslocando-se o revólver com a objetiva adquiriram-se imagens do escoamento do fluido no interior do microcanal em vários planos, na direção perpendicular ao seu escoamento. Para obter estas imagens com a qualidade necessária para a posterior obtenção dos mapas de vetores, foi necessário um processo de otimização das condições de operação, quer em termos de concentração das partículas fluorescentes, quer em termos de definição do laser e taxa de aquisição das imagens. As condições indicadas na Tabela 9 foram as que melhor se ajustaram para a realização destes ensaios, onde se estudou o escoamento da água no canal de acrílico.

**Tabela 9 - Condições da técnica de micro-PIV usadas nos ensaios realizados com o canal de acrílico, onde se controlou o caudal de escoamento do fluido através da diferença de altura entre duas seringas.**

Concentração de partículas	1:5000 (v/v)
Tempo entre pulsos	1600 $\mu$ s
Trigger rate	6 Hz
Potência do laser	High
Energia do laser	700 mJ
Nº de imagens adquiridas por ensaio	100

As condições de operação foram otimizadas de forma a fazer cumprir as duas regras fundamentais da técnica de micro-PIV, já referidas anteriormente: existirem cerca de 5 partículas por AI e estas apresentarem um deslocamento de aproximadamente 25% da AI entre cada par de imagens (*frames*) adquiridas. Foram realizados 14 ensaios com planos de focagem diferentes. O deslocamento imposto ao revólver do microscópio (plano de focagem) nos vários ensaios, tendo como referência o plano de focagem da face inferior do microcanal, está descrito na Tabela 10.

**Tabela 10 - Deslocamento do revólver do microscópio usado em cada ensaio, contabilizado após a focagem da face inferior da placa do microcanal.**

Ensaio	Deslocamento do revólver (mm)
1	0,765
2	0,794
3	0,810
4	0,818
5	0,830
6	0,838
7	0,845
8	0,856
9	0,864
10	0,872
11	0,880
12	0,890
13	0,901
14	0,910

O tratamento efetuado às imagens adquiridas foi descrito anteriormente, no Capítulo 3, na secção 3.4.2. Para a obtenção dos mapas de vetores, o algoritmo que se mostrou mais vantajoso foi o *average correlation*, aplicado com áreas de interrogação de  $32 \times 32$  pixéis e com uma sobreposição (*overlap*) de 50% nas duas direções ( $x$  e  $y$ ). O valor do *scale factor* para estes ensaios foi de 0,1091. Na Figura 31 encontra-se o mapa de vetores correspondente à medição 14, onde o deslocamento da objetiva foi de 0,910 mm e onde a direção do escoamento é traduzida por  $y$ .

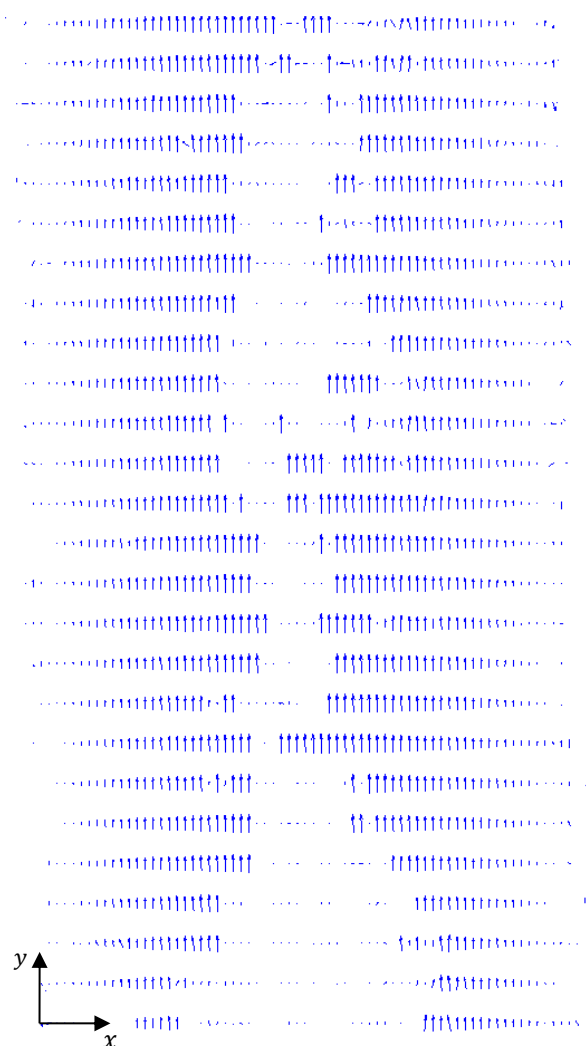
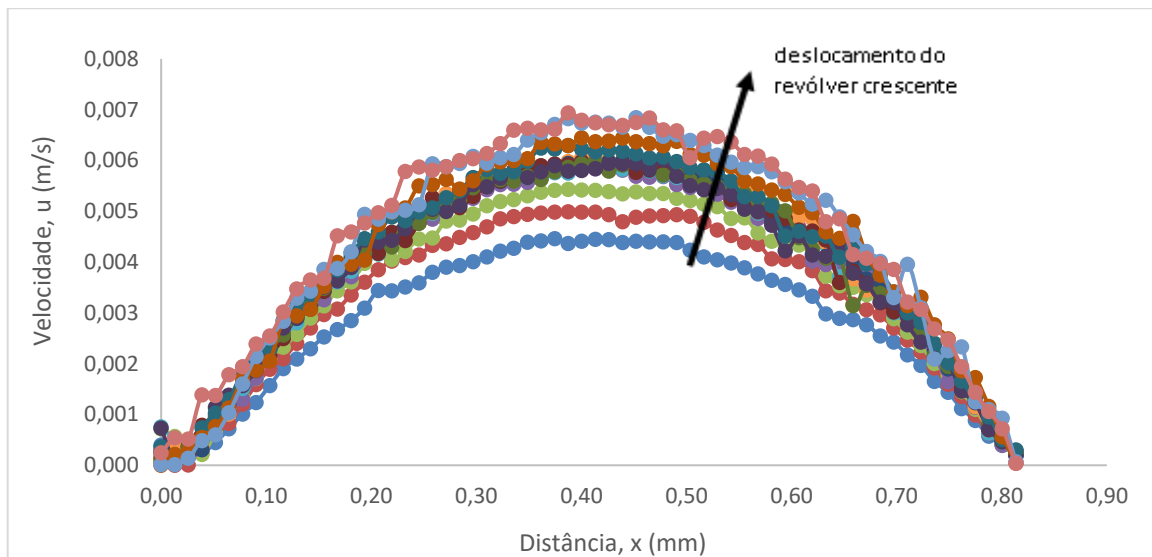


Figura 31 - Mapa de vetores obtido para o ensaio realizado com o canal de acrílico onde se controlou o caudal de escoamento pela diferença de alturas entre duas seringas e o plano de focagem foi de 0,910 mm.

Para facilitar a visualização dos vetores no mapa, foi utilizada uma funcionalidade do *software* (*vector map*), onde se seleccionou a opção de representar apenas um em cada seis vetores existentes no mapa de vetores original na direção  $y$ . Esta funcionalidade foi utilizada em todos os mapas de vetores que serão apresentados daqui para a frente. Como é possível verificar na Figura 31, o mapa de vetores não se encontra uniforme, o que provavelmente se deveu à acumulação de partículas nas paredes do canal. No início do trabalho prático, o procedimento experimental que foi descrito no Capítulo 3 na secção 3.4, ainda não se encontrava otimizado, o que resultou em ensaios muito longos e onde ainda não se tinha em consideração a importância da limpeza adequada de todo o material. Mais tarde, verificou-se que estes dois fatores contribuem para a acumulação de partículas nas paredes do canal e a consequente diminuição da qualidade das imagens adquiridas.

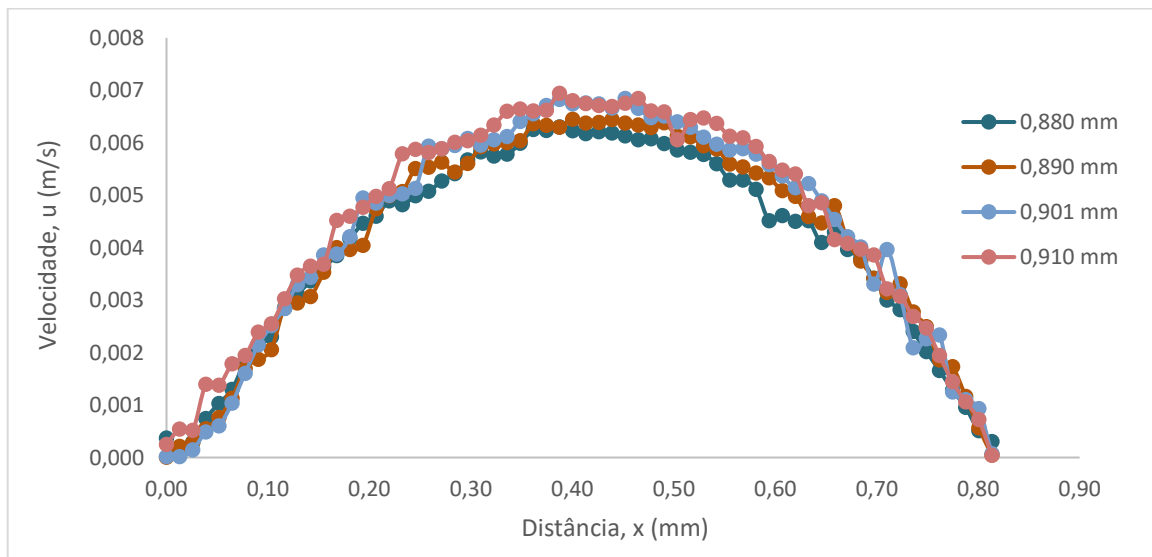
A partir do mapa de vetores é possível obter o perfil de velocidade do escoamento do fluido, para diferentes valores de  $y$ , e averiguar qual a variação da velocidade ao longo do diâmetro do canal (direção  $x$  indicada na Figura 31). Neste caso, não foi possível obter a determinação dos perfis de velocidade para o mesmo valor de  $y$  em todos os ensaios, uma vez que a não uniformidade dos mapas de vetores não o permitiu. Obteve-se, assim, o perfil de velocidade para cada um dos 14 ensaios em diferentes cotas de  $y$ , que estão apresentados na Figura 32.





**Figura 32 - Comparação dos perfis de velocidade para planos de focagem diferentes obtidos com o canal de acrílico, onde se controlou o caudal de escoamento pela diferença de alturas entre duas seringas.**

Por análise da Figura 32 é possível verificar que a velocidade de escoamento do fluido na zona central do canal aumenta para planos de focagem mais distantes da superfície da placa, pelo que, tudo indica que se vai aproximando do eixo do canal, pois o perfil parabólico esperado apresenta aí o seu máximo. De forma a obter uma comparação mais direcionada aos planos de focagem perto do que se pensava ser o eixo do canal, decidiu-se, a partir daqui, selecionar, tratar e analisar apenas os quatro perfis onde se obteve uma velocidade mais elevada. Assim, na Figura 33 encontram-se os perfis obtidos para os quatro últimos ensaios, cujos planos de focagem se encontram entre 0,880 mm e 0,910 mm da superfície da placa em acrílico que contém o canal, e onde se registou a maior velocidade.



**Figura 33 - Comparação dos perfis de velocidade para os quatro planos de focagem onde se obteve uma velocidade mais elevada, entre 0,880 mm e 0,910 mm, obtidos com o canal de acrílico e onde se controlou o caudal de escoamento pela diferença de alturas entre duas seringas.**

Observando a Figura 33 é possível verificar que a forma dos perfis de velocidade dos quatro ensaios se assemelham à de uma função parabólica. Tal como já foi referido, o perfil de velocidades no escoamento laminar perfeitamente desenvolvido através de um canal é

parabólico, onde a velocidade máxima ocorre no eixo central e a velocidade mínima (zero) na parede do canal. A Equação 8 mostra a função  $u(r)$  que traduz o perfil de velocidades.

$$u(r) = u_{m\acute{a}x} \left( 1 - \frac{r^2}{R^2} \right) \quad (8)$$

onde  $R$  é o valor do raio do canal,  $r$  traduz a direção radial e  $u_{m\acute{a}x}$  é a velocidade máxima.

Para facilitar a comparação dos perfis de velocidade medidos com o esperado teoricamente para o regime laminar, representou-se o perfil de velocidade parabólico esperado para o regime laminar (numa forma adimensionalizada) juntamente com os perfis de velocidade anteriores (Figura 33) depois de normalizados pelo valor máximo observado para a velocidade. Na Figura 34 encontra-se esta representação, onde o perfil de velocidade teoricamente esperado está indicado por uma linha de cor vermelha a cheio. Da análise desta representação é possível verificar que os perfis obtidos se aproximam do que seria esperado para o fluido a escoar em regime laminar, pelo que tudo indica que as medições foram efetuadas em planos próximos do eixo do canal.

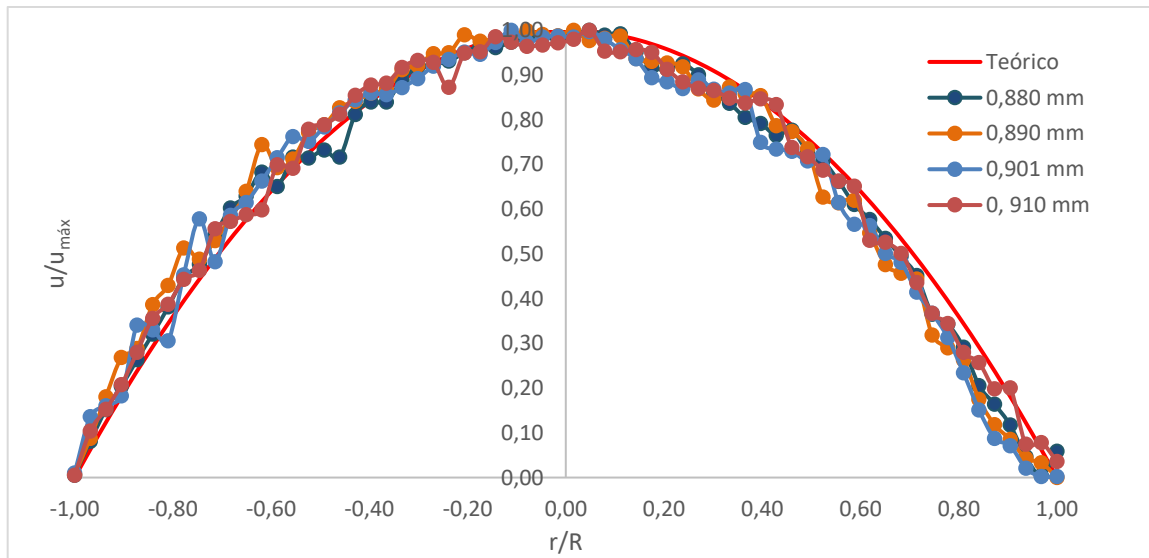


Figura 34 - Comparação dos perfis de velocidade normalizados para os quatro planos de focagem onde se obteve uma velocidade mais elevada (entre 0,880 mm e 0,910 mm), obtidos com o canal de acrílico e onde se controlou o caudal de escoamento pela diferença de altura entre duas seringas, com o perfil de velocidade teórico do regime laminar.

Quando a bomba de seringa ficou disponível para ser utilizada no trabalho experimental, decidiu-se voltar a reproduzir as experiências anteriores com o objetivo de validar estes resultados ao compará-los com os obtidos usando a bomba de seringa. Assim, foram mantidas as condições de operação descritas na Tabela 9, variando-se apenas o modo como o caudal de escoamento do fluido foi imposto. Para se impor um caudal de escoamento na bomba de seringa houve necessidade de determinar o caudal que, na experiência anterior, equivalia à diferença de altura entre a superfície livre do líquido (10 cm) nas duas seringas. O caudal de escoamento foi, então, determinado por integração numérica dos perfis de velocidade obtidos, tal como será explicado de seguida.

O caudal de fluido que atravessa uma coroa circular de área infinitesimal  $dA$  aberta ao escoamento, é também ele infinitesimal ( $d\dot{Q}$ ) e pode ser obtido de:

$$d\dot{Q} = u(r) \times dA \quad (9)$$

em que  $u(r)$  é dado pela Equação 8 e  $dA$  é igual a  $2\pi r dr$ . Substituindo estes resultados na Equação (9) e integrando a equação resultante sobre toda a secção reta circular do canal, obtém-se,

$$\dot{Q} = \int_0^{\dot{Q}} d\dot{Q} = \int_0^R u_{m\acute{a}x} \left(1 - \frac{r^2}{R^2}\right) \times 2r\pi dr \quad (10)$$

Para determinar o caudal de escoamento,  $\dot{Q}$ , resolveu-se o integral traduzido na Equação (10) numericamente, usando a regra dos trapézios.

Como para regime laminar a velocidade média do fluido em escoamento é metade do seu valor máximo esperado para o eixo de canal, o valor do caudal foi também calculado a partir do produto do valor médio calculado para a velocidade com o valor da área da secção reta do canal ( $\pi R^2$ ).

Na Tabela 11 encontram-se os resultados dos valores de caudal determinados por estes dois métodos.

**Tabela 11 - Valores do caudal volumétrico obtidos por integração numérica e pela velocidade média de escoamento na experiência realizada com o canal de acrílico e onde se controlou o caudal pela diferença de alturas entre duas seringas.**

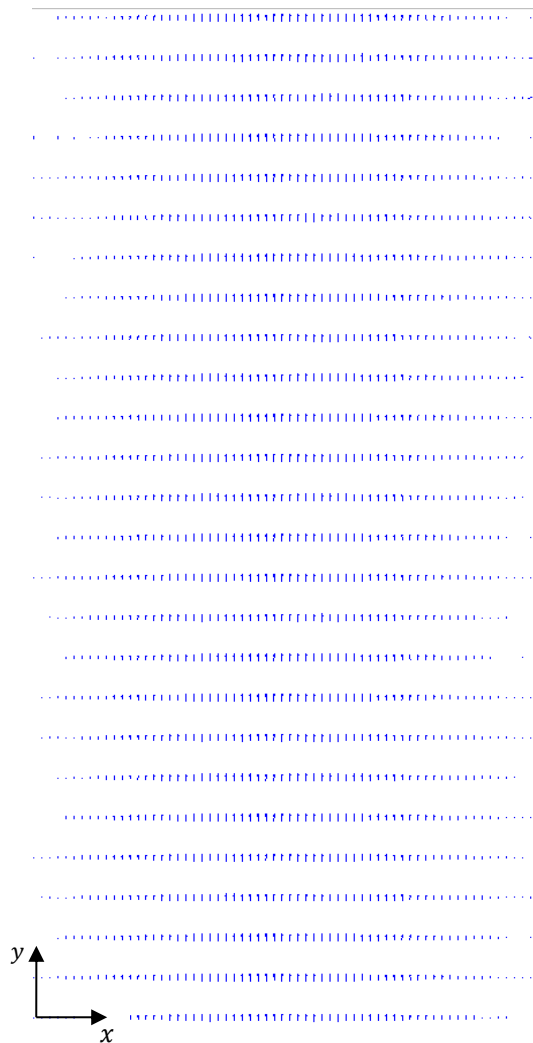
Ensaio	Deslocamento do revólver (mm)	Caudal obtido por integração (mL/min)	Caudal obtido pela velocidade média (mL/min)	Desvio percentual
11	0,880	0,095	0,098	2,98%
12	0,890	0,099	0,101	1,72%
13	0,901	0,102	0,107	4,39%
14	0,910	0,108	0,108	0,60%

Por análise da Tabela 11 verifica-se que os valores do caudal obtidos pelos dois métodos podem ser considerados semelhantes pois o desvio percentual entre eles é menor do que 5,00%. É ainda possível constatar que o valor do caudal determinado aumenta ligeiramente com o deslocamento do revólver, o que está de acordo com o que foi discutido anteriormente e pode ser observado na Figura 33.

#### 4.2.2. Controlo do caudal através da bomba de seringa

O caudal volumétrico a impor na bomba de seringa para reproduzir os ensaios descritos na secção anterior foi obtido pela média dos valores indicados na Tabela 11, que foi de 0,10 mL/min.

Realizou-se, assim, uma nova experiência, onde se manteve as condições descritas na Tabela 9 e se impôs um caudal de escoamento de 0,10 mL/min na bomba de seringa. O tratamento efetuado às imagens adquiridas foi o mesmo que o aplicado nos ensaios anteriores. O valor do *scale factor* para estes ensaios foi de 0,1115. Na Figura 35 encontra-se uma representação semelhante à apresentada na Figura 31, onde se mostra o mapa de vetores obtido no ensaio 14, onde o deslocamento da objetiva foi de 0,910 mm, para o escoamento da água segundo a direcção  $y$ .



**Figura 35 - Mapa de vetores obtido para o ensaio realizado com o canal de acrílico onde se impôs um caudal de escoamento de 0,10 mL/min na bomba de seringa e o deslocamento da objetiva foi de 0,910 mm.**

Da Figura 35 é possível verificar que o mapa de vetores obtido neste ensaio é uniforme, ao contrário do apresentado na Figura 31, o que reflete o facto de se ter otimizado o procedimento de limpeza do microcanal e dos tubos. Por outro lado, é possível verificar que a grandeza dos vetores apresentados, essencialmente na zona central do canal, são notoriamente inferiores. A partir do mapa de vetores foi possível obter o perfil de velocidade do escoamento do fluido, para diferentes valores de  $y$ , para averiguar se o padrão era mantido ao longo do comprimento do canal. Na representação da Figura 36 estão apresentados três perfis de velocidade correspondentes ao ensaio 14 (deslocamento da objetiva de 0,910 mm) obtidos em localizações  $y$  diferentes.

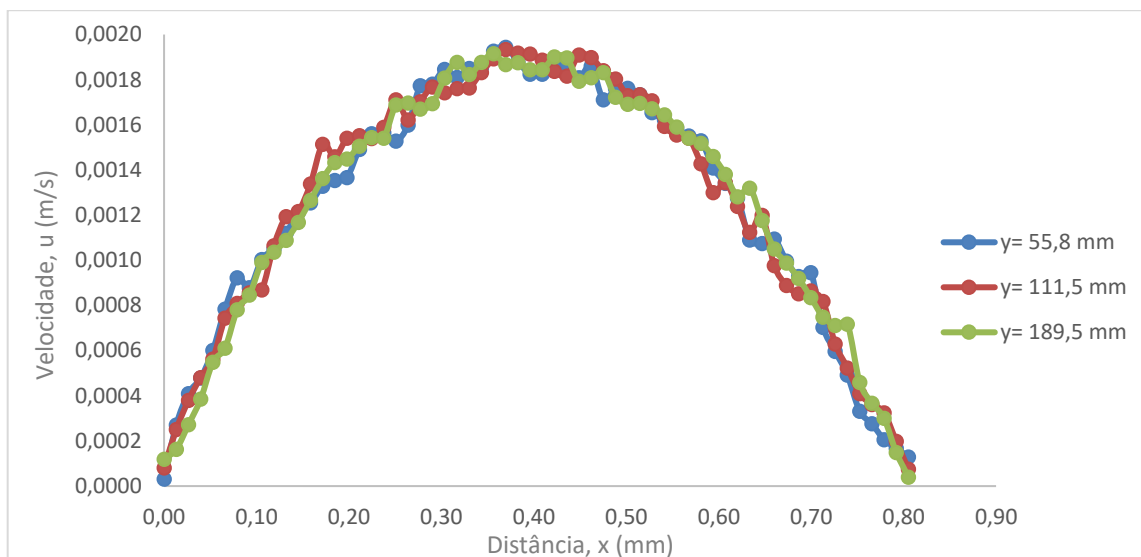


Figura 36 - Representação do perfil de velocidade em diferentes localizações de  $y$  para o ensaio realizado com o canal de acrílico, onde se impôs um caudal de escoamento de 0,10 mL/min na bomba de seringa e o deslocamento da objetiva foi de 0,910 mm.

Os perfis de velocidade obtidos para diferentes valores de  $y$  no mesmo mapa de vetores apresentados na Figura 36 são muito semelhantes, o que indica que o fluido se encontrava já a escoar em regime permanente e, por isso, não existem variações (significativas) dos perfis segundo a direção do escoamento. O mesmo se verificou para os restantes planos de focagem onde se realizaram as medições.

À semelhança do que foi feito na experiência anterior, traçaram-se os perfis de velocidade para cada uma das medições realizadas em planos de focagem diferentes, que correspondem aos 14 ensaios, obtendo-se a representação da Figura 37.

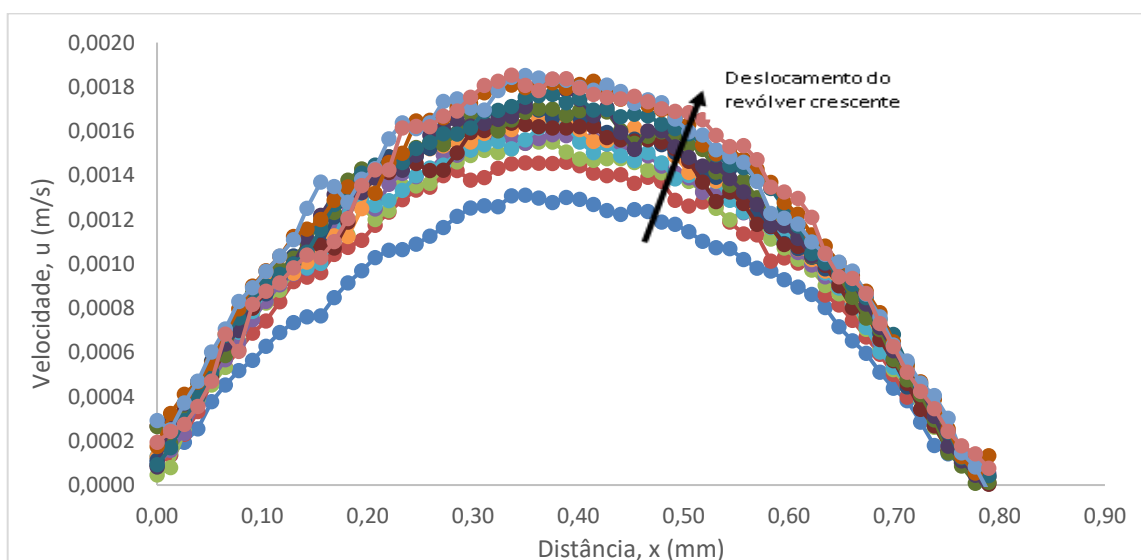


Figura 37 - Comparação dos perfis de velocidade para planos de focagem diferentes, obtidos com o canal de acrílico e onde se impôs um caudal de escoamento de 0,10 mL/min na bomba de seringa.

Da análise da Figura 37 é possível verificar que a velocidade máxima de escoamento foi aumentando com o deslocamento do revólver do microscópio, ou seja, para planos de focagem paralelos ao escoamento mais interiores no canal. Uma vez que o objetivo era comparar os resultados obtidos nas duas experiências em que apenas se modificou a forma de impor o caudal (diferença de alturas entre a superfície livre do líquido em duas seringas ou bomba de seringa),

representaram-se os perfis de velocidade obtidos nas duas situações no mesmo gráfico (Figura 38). À semelhança do que foi feito anteriormente, também na Figura 38, apenas se representaram os perfis obtidos para os planos de focagem entre 0,880 mm e 0,910 mm da superfície da placa em acrílico que contém o canal, e onde se registou a maior velocidade no eixo central.

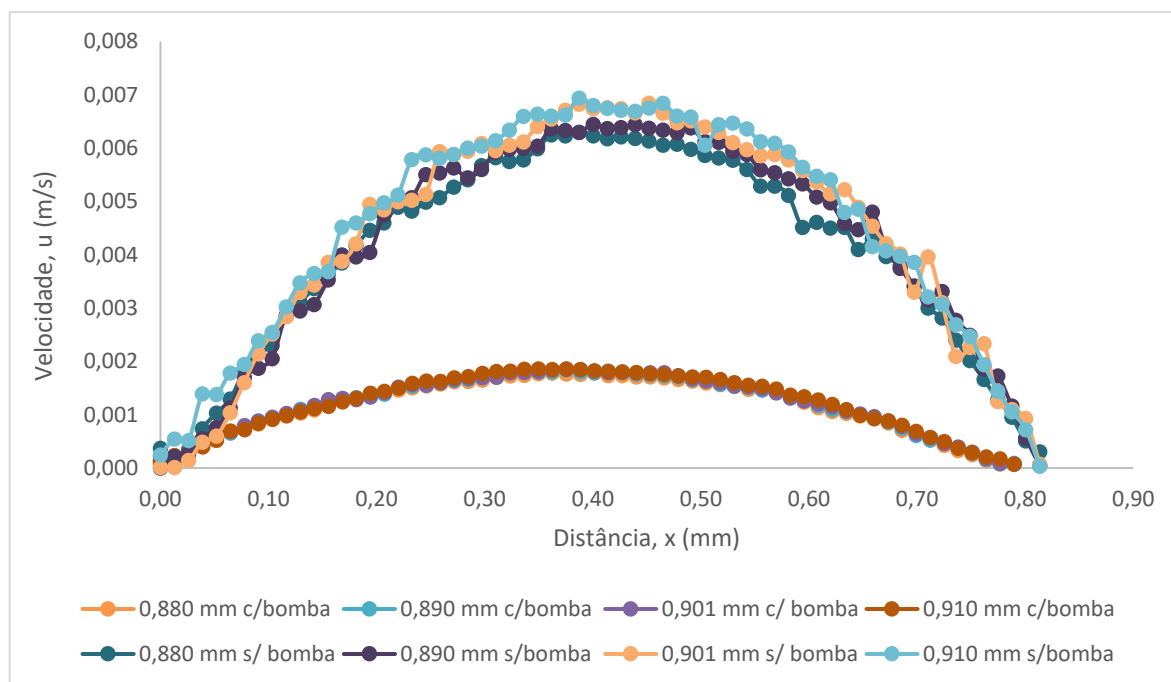


Figura 38 - Comparação dos perfis de velocidade de duas experiências para os quatro planos de focagem onde se obteve uma velocidade mais elevada (entre 0,880 mm e 0,910 mm), obtidos com o canal de acrílico, onde numa se controlou o caudal de escoamento pela diferença de alturas entre duas seringas e noutra se impôs 0,10 mL/min na bomba de seringa.

Tal como já tinha sido evidente no mapa de vetores apresentado na Figura 35, também é possível verificar na Figura 38 que os perfis de velocidade das duas experiências apresentam grandezas bastante diferentes, embora a forma dos perfis continue a ser semelhante à de uma parábola, tal como se pode constatar pela Figura 39.

Na Figura 39 representou-se o perfil de velocidade parabólico esperado para o regime laminar (numa forma adimensionalizada) juntamente com os perfis de velocidade obtidos na experiência realizada com a bomba de seringa, depois de normalizados pelo valor máximo observado para a velocidade. A linha vermelha (a cheio) representa o perfil de velocidades teórico (normalizado) para o regime de escoamento laminar. Mais uma vez, após a análise desta representação, tudo indica que as medições foram efetuadas próximas do eixo do canal e que o fluido se encontrava a escoar em regime laminar.

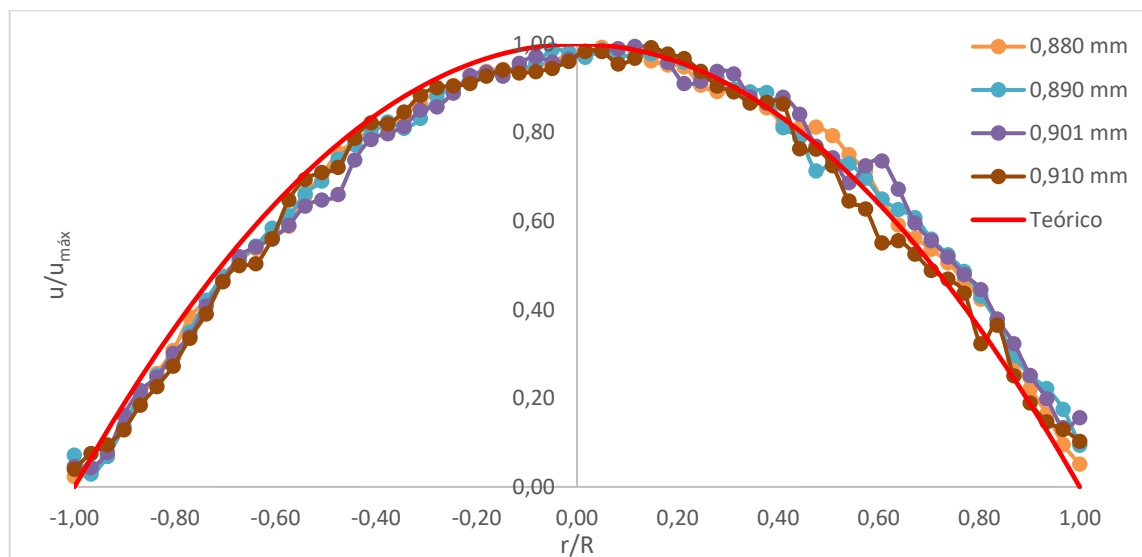


Figura 39 - Comparação dos perfis de velocidade normalizados para os quatro planos de focagem onde se obteve uma velocidade mais elevada (entre 0,880 mm e 0,910 mm), obtidos com o canal de acrílico e onde se impôs um caudal de escoamento de 0,10 mL/min na bomba de seringa, com o perfil de velocidade teórico do regime laminar.

Uma vez que se verificou uma diferença muito significativa entre os resultados obtidos nas duas experiências, o que não era esperado pois pensava-se ter modificado apenas a forma de impor/controlar o caudal volumétrico da água, decidiu-se repetir a experiência onde se utilizou a bomba de seringa, como forma de validar os resultados apresentados nesta secção. Decidiu-se, ainda, determinar o caudal volumétrico para o escoamento da água a partir dos perfis de velocidade obtidos e comparar com o caudal imposto na bomba de seringa.

Na Figura 40 encontram-se os perfis de velocidade obtidos para o último ensaio, onde o plano de focagem era de 0,910 mm relativamente à superfície da placa em acrílico que contém o canal e onde se registou a maior velocidade, para as duas experiências realizadas em condições semelhantes. Os perfis de velocidade apresentados na Figura 40 para as duas experiências são semelhantes, o que indica que os resultados obtidos são reproduzíveis.

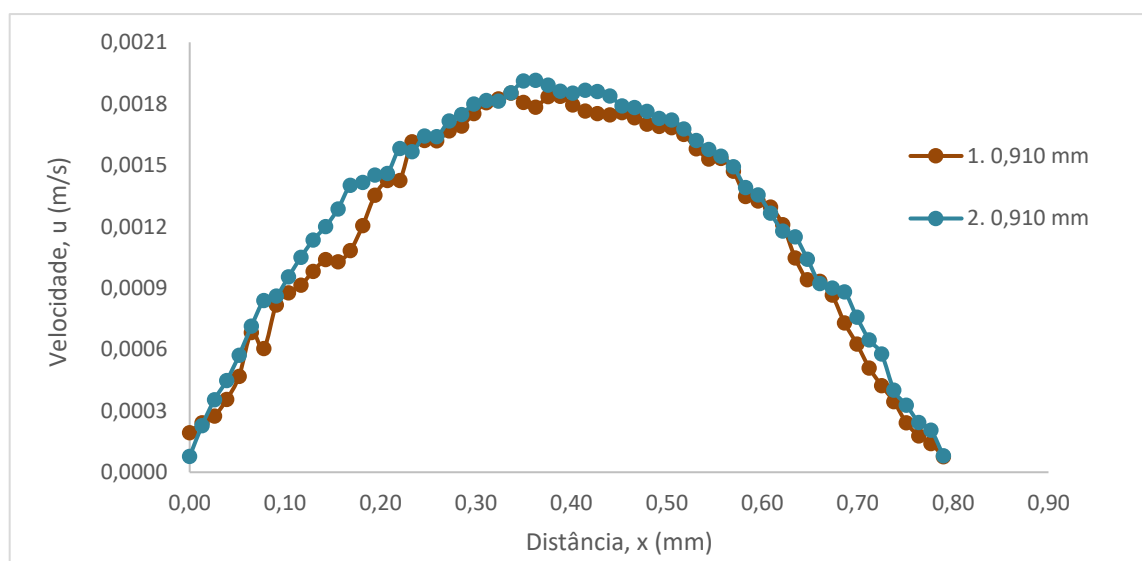


Figura 40 - Comparação do perfil de velocidades obtido para um plano focal de 0,910 mm em experiências diferentes mas realizadas em iguais condições.

Na Tabela 12 encontram-se os valores calculados para o caudal, quer por integração numérica, quer pela velocidade média, para as duas experiências onde se impôs um caudal de 0,10 mL/min

na bomba de seringa para promover a circulação da água através do microcanal em acrílico. Foram, ainda, determinados os desvios percentuais entre os valores do caudal obtidos para as duas repetições.

**Tabela 12 - Valores do caudal volumétrico calculado por integração numérica e pela velocidade média de escoamento da água, para as duas experiências realizadas em iguais condições e onde se impôs um caudal de escoamento de 0,10 mL/min.**

Ensaio	Deslocamento do revólver (mm)	Caudal obtido por integração			Caudal obtido pela velocidade média		
		Experiência 1 (mL/min)	Experiência 2 (mL/min)	Desvio percentual	Experiência 1 (mL/min)	Experiência 2 (mL/min)	Desvio percentual
11	0,880	0,026	0,027	5,10%	0,026	0,028	6,91%
12	0,890	0,027	0,028	1,29%	0,027	0,029	6,15%
13	0,901	0,027	0,028	2,57%	0,027	0,029	7,55%
14	0,910	0,026	0,030	12,89%	0,027	0,029	7,25%

Através da análise da Tabela 12, verifica-se que os valores do caudal obtidos quer por integração, quer pela velocidade média, são semelhantes e apresentam um desvio percentual entre as duas experiências inferior a 8,00% (exceto no caudal obtido por integração do ensaio 14), o que vem confirmar a existência de reprodutibilidade entre as experiências. No entanto, os valores obtidos em nada são semelhantes ao valor do caudal imposto na bomba de seringa (0,1 mL/min).

Uma vez que a única grande diferença que se pensava ter entre as experiências apresentadas nesta secção e a experiência descrita na secção anterior, era o modo de promover o escoamento do fluido (a água) no sistema, não se previa uma diferença tão significativa entre os mapas de vetores obtidos. Com o objetivo de tentar perceber a razão para o que estava a acontecer, pensou-se em medir o caudal volumétrico correspondente à diferença de 10 cm na altura da água entre as duas seringas usadas anteriormente como forma de promover o escoamento. Para isso, mediu-se o tempo necessário para recolher um determinado volume de água, tendo-se obtido um caudal médio de 0,337 mL/min (a medição foi feita em triplicado e os resultados encontram-se no Anexo C). Assim, verificou-se que o caudal obtido por integração numérica, cerca de 0,10 mL/min, não correspondia ao caudal que foi medido. Apesar da medição do caudal englobar alguns erros associados, pois o caudal volumétrico é baixo e o volume recolhido para a sua determinação foi reduzido para o tempo de recolha não ser muito grande, o que implicaria variações significativas na diferença de alturas entre a superfície livre do líquido nas duas seringas. Ora se o caudal da água que circulava no dispositivo microfluídico era cerca de três vezes ao que inicialmente se pensava, as condições de operação do sistema de micro-PIV usadas nestas experiências não estavam otimizadas para o caudal de 0,10 mL/min imposto na bomba de seringa. As condições estariam sim otimizadas para um caudal próximo de 0,337 mL/min. A confirmação de que as condições de aquisição usadas nas duas experiências onde se impôs um caudal de 0,10 mL/min na bomba de seringa não estavam corretas foi obtida quando se analisou as imagens adquiridas. Efetivamente, verificou-se que as partículas fluorescentes tinham um deslocamento inferior a 25% às dimensões da AI, evidenciando que o tempo entre pulsos deveria ter sido superior.

Assim, decidiu-se realizar uma nova experiência, aumentando o caudal de escoamento da água cinco vezes em relação ao usado anteriormente e otimizando devidamente as condições de operação do sistema de micro-PIV. Na Tabela 13 encontram-se as condições otimizadas e que foram usadas na aquisição das imagens com o sistema de micro-PIV, sendo que a suspensão das partículas traçadoras utilizada foi a mesma das experiências anteriores.



Tabela 13 - Condições usadas na aquisição das imagens com o sistema de micro-PIV nos ensaios realizados com o canal de acrílico e onde se impôs um caudal de escoamento de 0,50 mL/min na bomba de seringa.

Tempo entre pulsos	1000 $\mu$ s
Trigger rate	6 Hz
Potência do laser	High
Energia do laser	700 mJ
Nº imagens adquiridas	100

Os ensaios desta nova experiência foram realizados nos mesmos planos de focagem que os anteriores (descritos na Tabela 10), mas decidiu-se adquirir imagens para além dos 0,910 mm. Na Figura 41 encontra-se o mapa de vetores obtido para o ensaio 14, onde o deslocamento da objetiva foi de 0,910 mm. O valor do *Scale Factor* para estes ensaios foi de 0,1057. Mais uma vez a direção  $y$  traduz a direção do escoamento da água no microcanal.

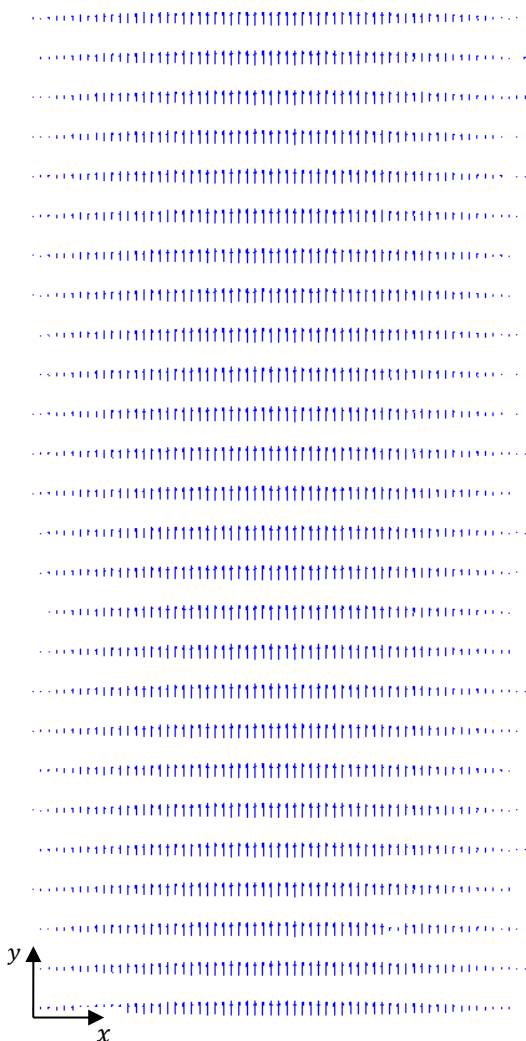


Figura 41 - Mapa de vetores obtido para o ensaio realizado com o canal de acrílico onde se impôs um caudal de escoamento de 0,50 mL/min na bomba de seringa e o deslocamento da objetiva foi de 0,910 mm.

O mapa de vetores da Figura 41 apresenta, como seria de esperar, vetores de velocidade com um comprimento maior, em particular na região central do canal. Isto provavelmente deve-se não só ao facto de o caudal imposto na bomba seringa ser agora cerca de cinco vezes superior, mas também por o tempo entre pulsos do laser ter sido ajustado para as condições usadas. O tempo entre pulsos é um parâmetro muito importante a ter em conta na técnica de micro-PIV e, como foi discutido anteriormente, condiciona a qualidade dos resultados obtidos.

Os valores do caudal obtido por integração numérica e pela velocidade média de escoamento para os ensaios estão representados na Tabela 14.

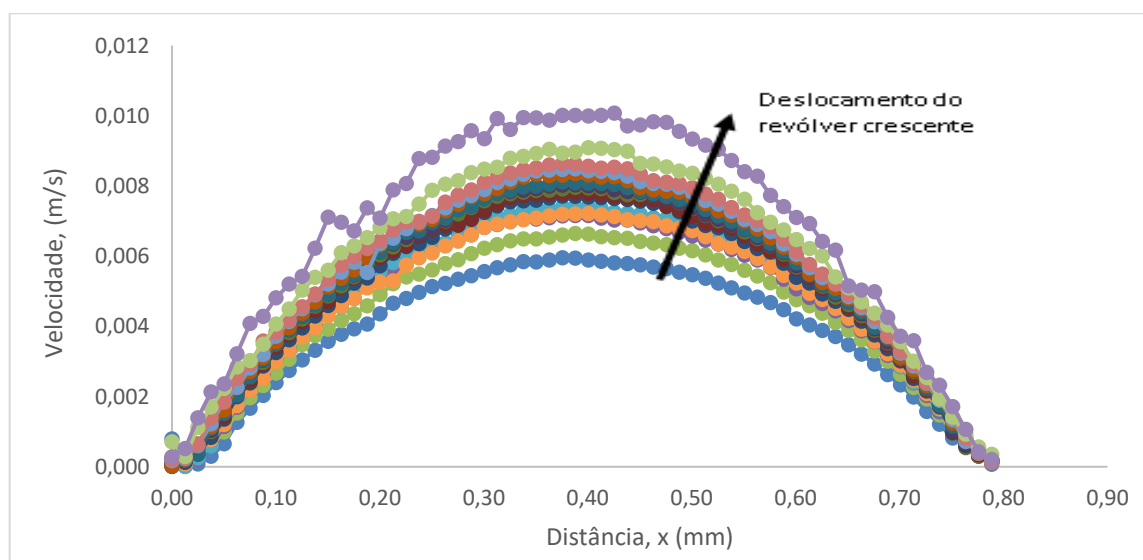
**Tabela 14** - Valores do caudal obtidos por integração numérica e pela velocidade média de escoamento para a experiência realizada com um caudal de 0,5 mL/min.

Ensaio	Deslocamento do revólver (mm)	Caudal obtido por integração (mL/min)	Caudal obtido pela velocidade média (mL/min)	Desvio percentual
11	0,880	0,115	0,119	3,49%
12	0,890	0,118	0,123	3,89%
13	0,901	0,121	0,125	3,28%
14	0,910	0,124	0,127	2,31%
15	0,992	0,132	0,135	2,46%
16	1,092	0,146	0,150	2,76%
17	1,292	-	-	-

No último ensaio, onde o deslocamento do revólver foi de 1,292 mm, não foi possível obter o perfil de velocidade e, consequentemente determinar o caudal de escoamento, devido à falta de qualidade do mapa de vetores (como será esclarecido na análise da Figura 43).

Por análise da Tabela 14 verifica-se que os valores do caudal obtidos pelos dois métodos podem ser considerados semelhantes, sendo o desvio percentual entre eles sempre menor do que 4,00%. É ainda possível constatar que o valor do caudal determinado aumenta com o deslocamento do revólver, o que está de acordo com o que foi discutido anteriormente e pode ser observado na Figura 42.

Na Figura 42 encontra-se a representação gráfica dos perfis de velocidade obtidos para os 16 ensaios efetuados, onde se pode constatar que o fluido se encontra a escoar em regime laminar e que a velocidade aumenta à medida que se vai aumentando o deslocamento da objetiva.



**Figura 42** - Comparação dos perfis de velocidade obtidos para os 16 ensaios realizados com o canal de acrílico onde se impôs um caudal de escoamento de 0,50 mL/min na bomba de seringa.

A aquisição de imagens para além do plano de focagem das experiências anteriores demonstrou que a velocidade máxima de escoamento continuou a aumentar (como se verifica na Tabela 14 e na Figura 42). No entanto, o que por um lado sugere que ainda não se estaria a adquirir imagens no eixo do canal (e por isso, dever-se-ia ter continuado a deslocar a objetiva), por

outro, verificou-se que a qualidade das imagens (e consequentemente, dos mapas de vetores), diminuiu significativamente à medida que se avançou no plano de focagem, sugerindo que o plano de focagem já se encontrava fora do canal. Na Figura 43 encontram-se representados os mapas de vetores dos dois últimos ensaios, onde o deslocamento da objetiva foi de 1,092 mm e 1,292 mm, respetivamente. Mais uma vez, a direção  $y$  traduz a direção do escoamento da água no microcanal.

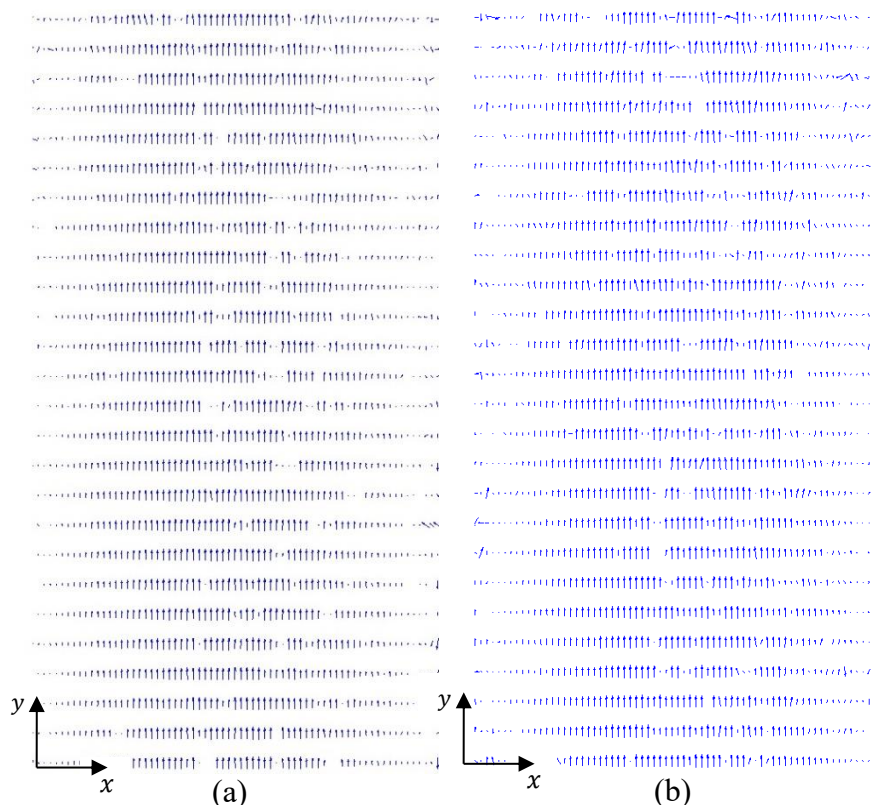


Figura 43 - Mapa de vetores obtido para a experiência realizada com o canal de acrílico onde se impôs um caudal de escoamento de 0,50 mL/min na bomba de seringa e o deslocamento da objetiva foi de (a) 1,092 mm e (b) 1,292 mm.

Por análise da Figura 43, e comparando com a Figura 39, verifica-se que a qualidade do mapa de vetores diminuiu significativamente. O facto de a maioria dos vetores do mapa se encontrarem sem sentido fez com que não fosse possível traçar o perfil de velocidades do escoamento e, consequentemente, determinar o caudal de escoamento.

Tal como se pode verificar através da análise da Tabela 14, os valores do caudal obtidos por integração e pela velocidade média de escoamento não correspondem ao caudal imposto na bomba (0,50 mL/min). Analisando a Tabela 12 e Tabela 14 verifica-se que, tanto na experiência onde se impôs um caudal na bomba de 0,10 mL/min como na de 0,50 mL/min, os valores do caudal obtidos por integração numérica do perfil de velocidades estão afetados de um erro de valor semelhante. Isto é, em ambas, o valor do caudal obtido por integração é cerca de 5 vezes menor do que o caudal imposto. Esta análise fez com que surgisse a hipótese de que estas determinações pudessem estar afetadas pelo facto de o índice de refração do material do canal (acrílico) ser diferente do índice de refração do fluido em escoamento (a água).

Posto isto, achou-se que seria vantajoso encontrar um fluido que tivesse o mesmo índice de refração que o acrílico e voltar a reproduzir as experiências. Se o valor do caudal determinado nestas novas experiências correspondesse ao caudal imposto na bomba, significaria que as medições anteriores estavam, de facto, afetadas de um erro devido à diferença do índice de refração entre os dois meios. Sentiu-se alguma dificuldade em encontrar o fluido indicado para

esta finalidade, não só porque teria que possuir um índice de refração igual ao do acrílico, mas também porque, devido às dimensões do canal, não podia ter uma viscosidade elevada. Depois de uma fase de pesquisa e de avaliação de vários potenciais fluidos para esta aplicação, verificou-se que uma solução de iodeto de zinco com uma concentração de 61,8 % (w/w) era a que indicava ter um índice de refração de 1,49, tal como o acrílico (Budwig, 1994; Hendriks, et al., 1982). No entanto, à data em que se escolheu seguir este procedimento, verificou-se que o reagente necessário, o iodeto de zinco, não se encontrava disponível no ISEC, pelo que se procedeu à sua requisição. Entretanto, como as objetivas de menor ampliação (de 2,5× e 5×) já se encontravam disponíveis para serem integradas no trabalho experimental, pensou-se que seria possível obter a conclusão pretendida utilizando o canal de PDMS e fazendo escoar uma solução com o mesmo índice de refração do material.

### 4.3. Canal de PDMS

Tal como aconteceu com o canal de acrílico, quando se iniciaram as experiências com o canal de PDMS houve necessidade de se otimizar as condições para aquisição das imagens do escoamento a usar no sistema de micro-PIV, assim como de localizar o plano de focagem que corresponderia ao eixo do canal. Utilizando como fluido uma solução aquosa de dimetil sulfóxido, DMSO, a 52% (w/w), com índice de refração igual ao do PDMS, possíveis distorções óticas causadas pela existência de dois meios com índice de refração diferente (o canal e o fluido em escoamento) seriam evitadas. O fluido apresenta, ainda, propriedades físicas semelhantes às do sangue e o caudal imposto para a circulação através do canal de PDMS foi de 15,0 mL/min (cerca de 10% do caudal da artéria coronária esquerda (Ramanathan, et al., 2005)), devido às limitações oferecidas pelo circuito disponível para o escoamento do fluido e relativas à própria bomba seringa disponível. Depois de várias tentativas, verificou-se que as condições descritas na Tabela 15 eram as que mais se adequavam para a aquisição das imagens com a técnica de micro-PIV, utilizando o canal de PDMS e o caudal de escoamento imposto ao fluido.

Tabela 15 - Condições usadas na aquisição das imagens com o sistema de micro-PIV nos ensaios realizados com o PDMS e onde se impôs um caudal de escoamento de 15,0 mL/min na bomba de seringa.

Tempo entre pulsos	300 $\mu$ s
Trigger rate	6 Hz
Potência do laser	High
Energia do laser	700 mJ
Nº imagens adquiridas por ensaio	100

As condições de operação foram otimizadas de forma a fazer cumprir as duas regras fundamentais da técnica de micro-PIV, já referidas anteriormente: existirem cerca de 5 partículas por AI e estas apresentarem um deslocamento de aproximadamente 25% da AI entre cada par de imagens (*frames*) adquiridas.

Com o objetivo de tentar localizar o plano do eixo do canal de PDMS, fez-se deslocar a objetiva em pequenos incrementos (de cerca de 0,02 mm), após a focagem da face inferior da placa que contém o canal, e procedeu-se à aquisição de imagens com a obtenção dos mapas de vetores e dos respetivos perfis de velocidade. Após a localização do eixo do canal (onde se registou a velocidade máxima), realizaram-se mais cinco ensaios: dois acima do plano de focagem do eixo do canal, um no eixo e dois abaixo do eixo do canal, sendo, no total, o deslocamento do revólver de 0,08 mm. Na Tabela 16 encontram-se os planos de focagem onde foram realizados os ensaios.

Tabela 16 - Plano de focagem do microscópio em cada ensaio, contabilizado após a focagem da face inferior da placa do microcanal de PDMS.

Ensaio	Deslocamento do revólver (mm)
1	1,500
2	1,502
3	1,504
4	1,506
5	1,508

O tratamento efetuado às imagens adquiridas foi descrito anteriormente no Capítulo 3, na secção 3.4.2.. Para a obtenção dos mapas de vetores, o algoritmo que se mostrou mais vantajoso foi o *average correlation*, aplicado com áreas de interrogação de  $32 \times 32$  pixéis e com uma sobreposição (*overlap*) de 50% nas duas direções (*x* e *y*). O valor do *scale factor* para estes ensaios foi de 0,3876. Na Figura 44 encontra-se o mapa de vetores correspondente ao eixo do canal, onde o deslocamento da objetiva foi de 1,504 mm (ensaio 3) e onde a direção do escoamento é traduzida por *y*.

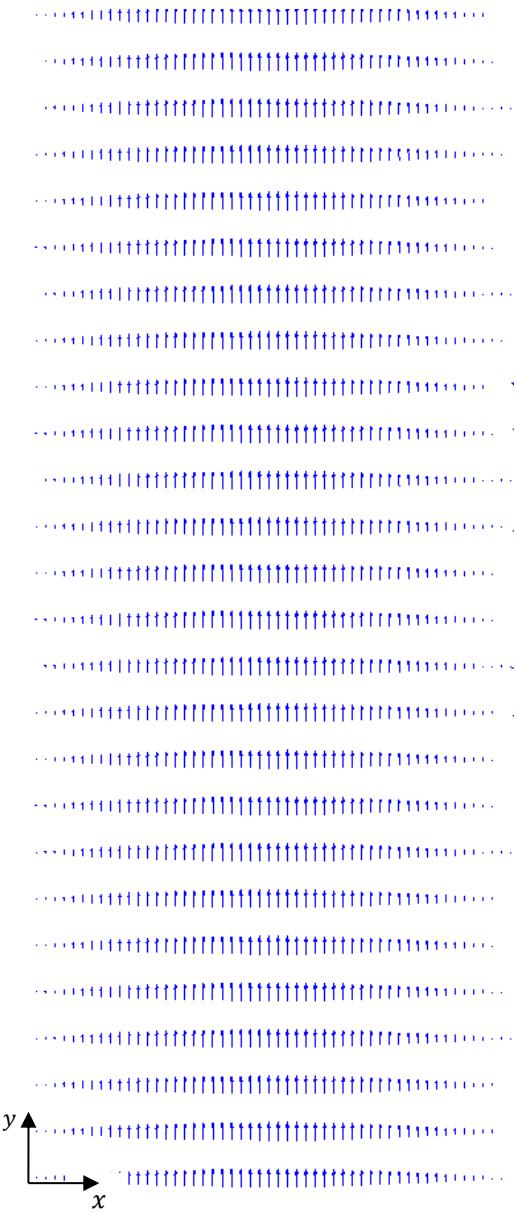


Figura 44 - Mapa de vetores obtido para o ensaio realizado com o canal de PDMS onde se impôs um caudal de escoamento de 15,0 mL/min na bomba de seringa e para um deslocamento do revólver de 1,504 mm.

Mais uma vez, foi utilizada a funcionalidade do *software vector map*, no mapa de vetores, pelo que, apenas é representado um em cada seis vetores, do mapa de vetores original, na direção  $y$ . A partir do mapa de vetores é possível obter o perfil de velocidade, para diferentes valores de  $y$ , do escoamento do fluido e averiguar qual a variação da velocidade ao longo do diâmetro do canal. Na Figura 45 encontra-se a representação dos perfis de velocidade para o ensaio realizado no eixo do canal em diferentes cotas de  $y$ .

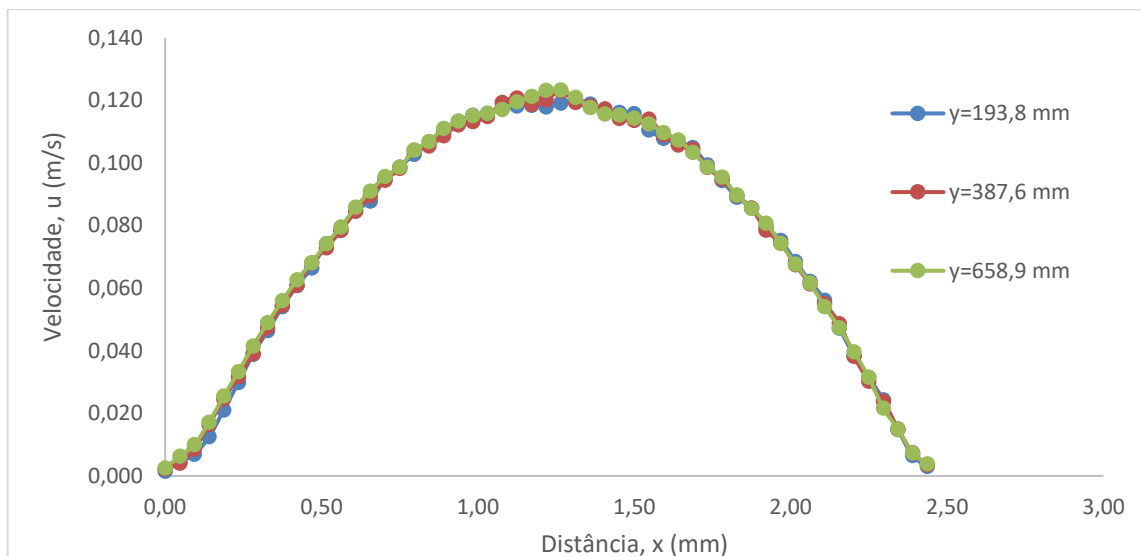


Figura 45 - Representação do perfil de velocidade para diferentes valores de  $y$  para o ensaio realizado com o canal de PDMS, onde se impôs um caudal de escoamento de 15,0 mL/min na bomba de seringa e o deslocamento da objetiva foi de 1,504 mm.

Por análise da Figura 45 verifica-se que os perfis de velocidade obtidos para os diferentes valores de  $y$  do mapa de vetores para o mesmo ensaio são praticamente coincidentes, o que indica que o fluido se encontrava em escoamento permanente, tendo-se verificado o mesmo para os restantes planos de focagem onde se realizaram os ensaios. Na Figura 46 encontram-se representados os perfis de velocidade obtidos para os 5 ensaios, onde cada um deles resulta da média do perfil de velocidade traçado para as diferentes cotas de  $y$  do mapa de vetores.

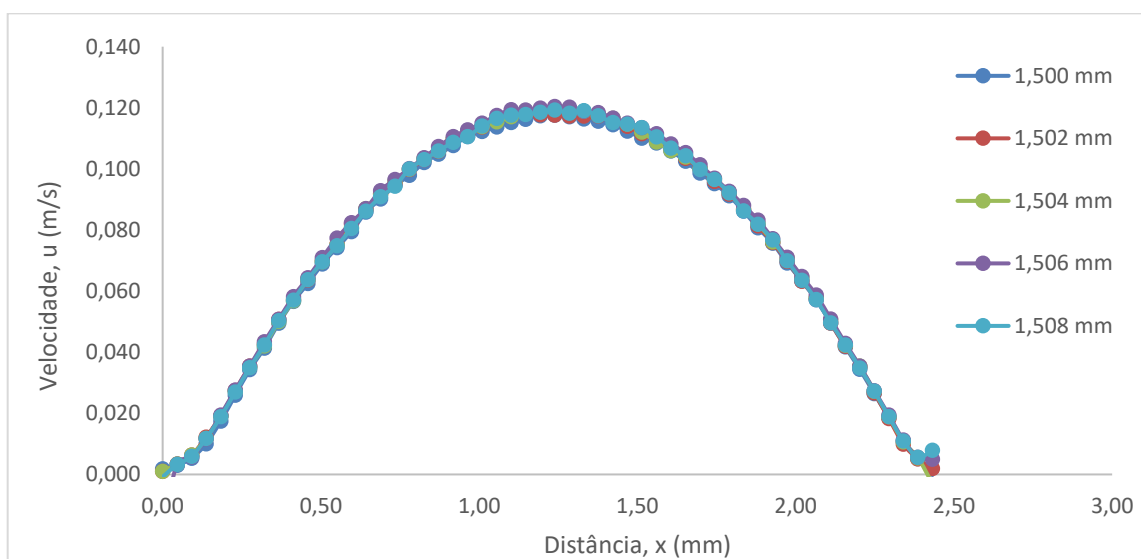
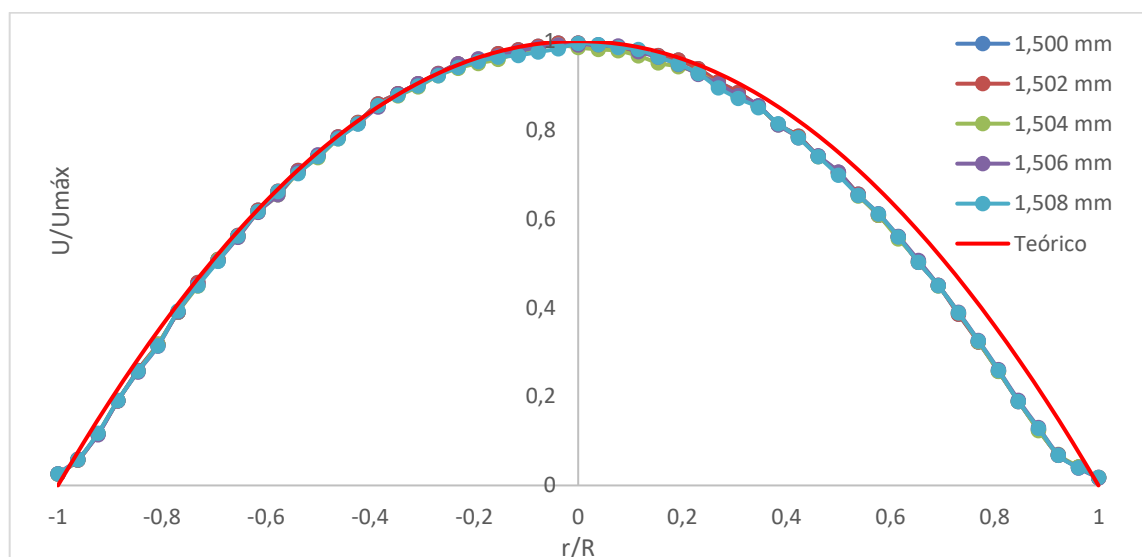


Figura 46 - Comparação dos perfis de velocidade para os cinco planos de focagem, entre 1,500 mm e 1,508 mm, obtidos com o canal de PDMS, onde se impôs um caudal de escoamento na bomba seringa de 15,0 mL/min.

Analisando a Figura 46, verifica-se que a velocidade de escoamento nestes ensaios é muito semelhante, o que se deve ao facto de se ter deslocado o revólver em incrementos muito

reduzidos (de 0,02 mm). Na Figura 47 representou-se o perfil de velocidade parabólico esperado para o regime laminar (numa forma adimensionalizada) juntamente com os perfis de velocidade anteriores (Figura 46) depois de normalizados pelo valor máximo observado para a velocidade. A linha vermelha (a cheio) representa o perfil de velocidades teórico normalizado para um regime de escoamento laminar. Da análise desta representação é possível verificar que as medições foram efetuadas próximas do eixo do canal e que o fluido se encontrava a escoar em regime laminar.



**Figura 47 - Comparação dos perfis de velocidade normalizados para os cinco planos de focalização, entre 1,500 mm e 1,508 mm, obtidos com o canal de PDMS, onde se impôs um caudal de escoamento na bomba de seringa de 15,0 mL/min, com o perfil de velocidade teórico do regime laminar.**

Na Tabela 17 encontram-se os valores do caudal calculados por integração numérica e pela velocidade média de escoamento, para os cinco ensaios, onde se impôs um caudal na bomba de seringa de 15,0 mL/min.

**Tabela 17 - Valores da determinação do caudal volumétrico por integração numérica e pela velocidade média de escoamento nos ensaios realizados com o canal de PDMS e onde impôs um caudal de escoamento na bomba de seringa de 15,0 mL/min.**

Ensaio	Deslocamento do revólver (mm)	Caudal obtido por integração (mL/min)	Caudal obtido pela velocidade média (mL/min)	Desvio percentual
1	1,500	15,388	16,616	7,68%
2	1,502	15,587	16,775	7,34%
3	1,504	15,768	17,045	7,79%
4	1,506	15,667	16,888	7,49%
5	1,508	15,638	16,888	7,68%

Por análise da Tabela 17, verifica-se que para ambos os métodos, o caudal teve um valor máximo quando o deslocamento do revólver foi de 1,504 mm, tal como já foi discutido anteriormente. Os valores do caudal obtidos por integração e pela velocidade média podem ser considerados semelhantes, sendo o desvio percentual entre eles sempre menor do que 8,00%. Este desvio pode ser justificado devido à existência de uma ligeira assimetria dos perfis de velocidade relativamente ao esperado teoricamente, tal como se verifica na Figura 47.

Em ambas as determinações o caudal obtido é semelhante ao que foi imposto na bomba (15,0 mL/min), o que levou a concluir que a hipótese colocada anteriormente (na secção 4.2), de que

as medições estavam afetadas de distorções óticas devido à diferença de índice de refração entre os dois meios (o canal e o fluido), era legítima.

#### 4.3.1. Aferição da reprodutibilidade da técnica de micro-PIV na caracterização do escoamento

De forma a validar os resultados obtidos na experiência anterior, apresentados na Tabela 17, e avaliar a reprodutibilidade da técnica, decidiu-se repetir a experiência anterior por mais duas vezes. Na Figura 48 encontram-se os perfis de velocidade obtidos para os três ensaios onde o plano de focagem foi o eixo do canal, ou seja, quando se deslocou o revólver de 1,504 mm.

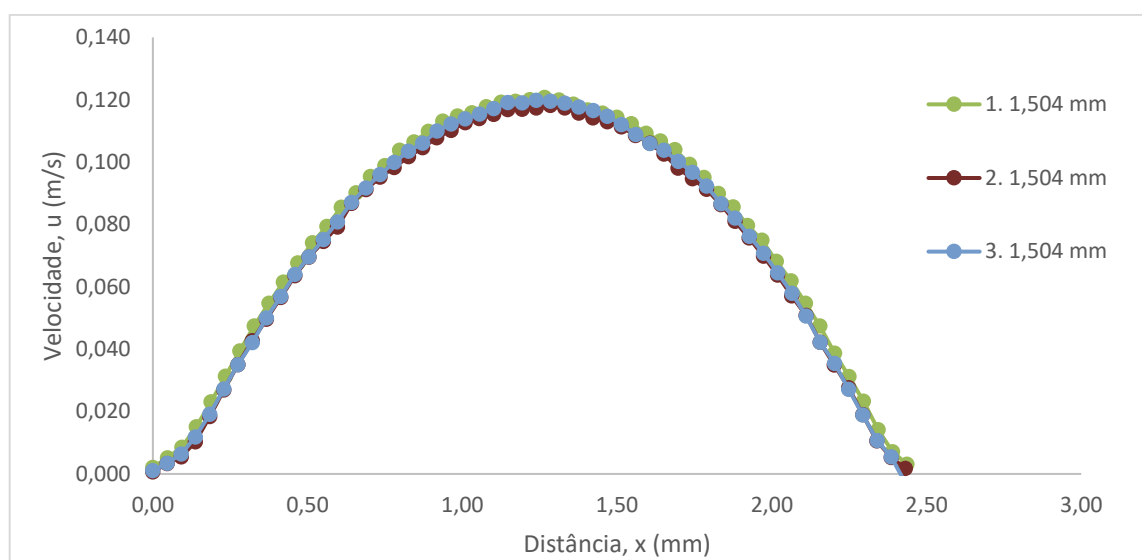


Figura 48 - Comparação dos perfis de velocidade de três experiências realizadas em iguais condições, com o canal de PDMS, para o plano de focagem do eixo do canal, 1,504 mm, onde se impôs um caudal de escoamento de 15,0 mL/min na bomba de seringa.

Os perfis de velocidade apresentados na Figura 48 e que foram extraídos dos mapas de vetores resultantes dos três ensaios realizados nas mesmas condições, para o mesmo valor de  $y$ , são praticamente coincidentes, o que indica a existência de reprodutibilidade entre as três experiências. Na Tabela 18 encontram-se os valores determinados para o caudal de escoamento, quer por integração numérica, quer através da velocidade média para o escoamento, para os cinco ensaios das três experiências realizadas nas mesmas condições.

Tabela 18 - Valores da determinação do caudal volumétrico por integração numérica e pela velocidade média de escoamento para as três experiências realizadas em iguais condições e onde se impôs um caudal de escoamento na bomba de seringa de 15,0 mL/min.

Ensaio	Deslocamento do revólver (mm)	Experiência 1		Experiência 2		Experiência 3	
		Caudal obtido por integração (mL/min)	Caudal obtido pela velocidade média (mL/min)	Caudal obtido por integração (mL/min)	Caudal obtido pela velocidade média (mL/min)	Caudal obtido por integração (mL/min)	Caudal obtido pela velocidade média (mL/min)
1	1,500	15,388	16,616	14,767	16,344	14,729	16,431
2	1,502	15,587	16,775	<b>14,848</b>	16,390	14,907	16,629
3	1,504	<b>15,768</b>	<b>17,045</b>	14,789	<b>16,567</b>	<b>14,976</b>	16,746
4	1,506	15,670	16,888	14,767	16,479	15,240	<b>16,896</b>
5	1,508	15,638	16,888	14,268	15,991	14,966	16,774

Para quantificar a dispersão dos resultados obtidos para o caudal de escoamento da solução aquosa de DMSO a partir das três experiências realizadas nas mesmas condições, foram



determinados dois parâmetros estatísticos, o desvio padrão e o coeficiente de variação, que estão indicados na Tabela 19.

**Tabela 19 - Valores de desvio padrão e variância para o caudal volumétrico (determinado por integração numérica e pela velocidade média de escoamento) entre as três experiências realizadas em iguais condições e onde se impôs um caudal de escoamento na bomba de seringa de 15,0 mL/min.**

Ensaio	Deslocamento do revólver (mm)	Caudal obtido por integração (mL/min)		Caudal obtido pela velocidade média (mL/min)	
		Desvio Padrão	Coeficiente de variação	Desvio Padrão	Coeficiente de variação
1	1,500	0,370	2,47%	0,139	0,84%
2	1,502	0,410	2,72%	0,194	1,17%
3	1,504	0,519	3,42%	0,242	1,44%
4	1,506	0,452	2,97%	0,239	1,42%
5	1,508	0,685	4,58%	0,488	2,95%

Através da análise da Tabela 18 é possível verificar que na repetição 2 o caudal de escoamento não apresenta o valor máximo para o mesmo plano de focagem quando é calculado por integração numérica do perfil de velocidade ou pela velocidade média para o escoamento. No entanto, a diferença entre o deslocamento do revólver para as duas situações referidas é muito pequena, sendo de apenas 0,002 mm. Este valor de 0,002 mm traduz também, de uma forma geral, a diferença entre o deslocamento do revólver que foi observada para focar o eixo do canal entre as várias repetições.

A dispersão de resultados em torno da média do caudal obtida nas três repetições da experiência, e traduzida pelo desvio padrão na Tabela 19, é pequena e, em termos percentuais, relativamente ao valor médio, não representa mais do que 4,58%. Esta análise indica uma boa reprodutibilidade entre os resultados obtidos nas três experiências realizadas com este equipamento em condições semelhantes, pelo que, a metodologia implementada na preparação e execução das experiências, assim como no tratamento das imagens adquiridas com vista ao mapa de vetores, parece ser eficaz.

#### **4.3.2. A influência do índice de refração nas medições**

Como tinha sido referido no capítulo 2, nomeadamente na secção 2.3.2, na técnica de micro-PIV utiliza-se uma iluminação por volume. Neste tipo de iluminação, todas as partículas que se encontram no interior do canal são iluminadas, independentemente de estarem focadas ou não. Consequentemente, toda a secção do canal é iluminada, fazendo com que a concavidade das paredes seja evidente nas imagens adquiridas, dificultando a identificação dos limites da parede do canal nas imagens adquiridas. Para além disso, a quantificação de distâncias junto da parede do canal estarão afetadas deste efeito de distorção ótica. Uma forma de colmatar este problema é utilizar um fluido com o mesmo índice de refração do material do canal.

Na Figura 49 encontra-se uma imagem com um canal de PDMS, fornecido por Costa (2016), onde se colocou uma gota da solução de DMSO a 52% (w/w). Para ser visível a distorção referida devido à curvatura da parede do canal este foi colocado sobre uma folha com uma escala milimétrica. Na zona onde se encontra a gota da solução de DMSO (círculo a vermelho) como existe semelhança do índice de refração entre o canal de PDMS e a solução de DMSO, a escala milimétrica não sofre distorção devido à curvatura das paredes do canal. Contudo, nas zonas do canal de PDMS onde no seu interior existe ar, um meio com índice de refração distinto do PDMS, é notória a distorção das linhas da escala milimétrica, o que será responsável por erros ao quantificar distâncias.

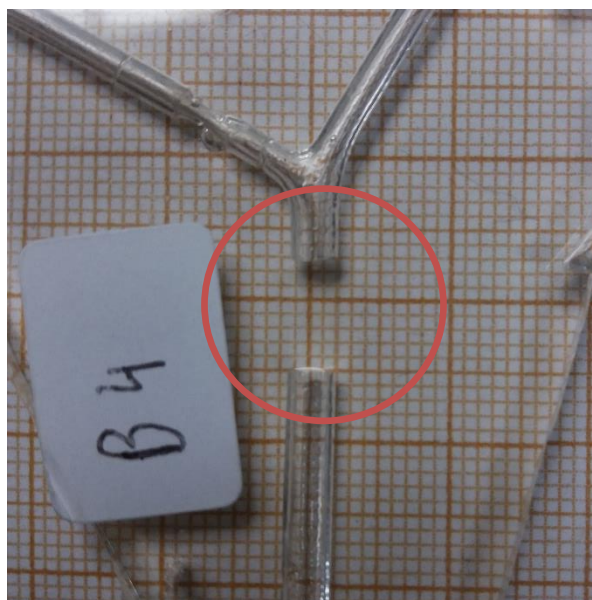


Figura 49 - Canal de PDMS onde se colocou uma porção da solução de DMSO a 52% (w/w) para evidenciar o efeito do índice de refração.

Foram, então, adquiridas imagens no plano de focagem do centro do canal de PDMS, com as mesmas condições de aquisição, mas com fluidos em escoamento diferentes. Duas destas imagens estão apresentadas na Figura 50, sendo que em (a) o fluido utilizado foi a água e em (b) a solução de DMSO a 52% (w/w). Como na imagem obtida com água a escoar no interior do canal de PDMS, os dois meios possuem índices de refração diferentes, embora o contraste dos tons de cinzento seja maior junto dos limites da parede existe uma grande dificuldade na identificação de qual a localização que traduzirá o seu limite devido a reflexos, para além de existirem os efeitos de distorção já referidos. Na imagem obtida com a solução de DMSO a 52% (w/w) em escoamento, a identificação dos limites do canal é feita com maior segurança e a quantificação do deslocamento das partículas fluorescentes não está afetado do efeito de distorção ótica já que os dois meios (fluido e canal) possuem o mesmo índice de refração.

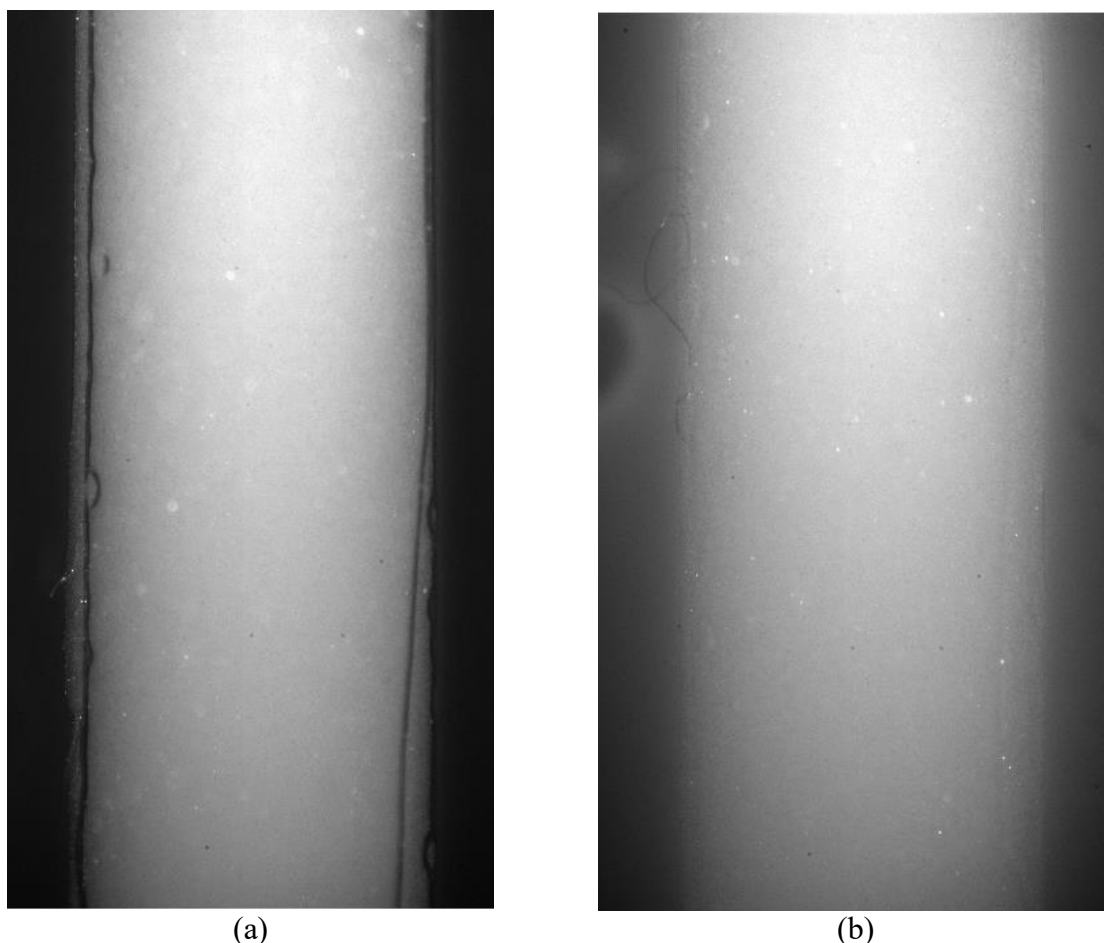


Figura 50 - Imagens da aplicação da técnica de micro-PIV adquiridas com o canal de PDMS (a) com água e (b) com uma solução de DMSO a 52% (w/w).

A análise da Figura 49 e da Figura 50 parece corroborar o que foi verificado ao longo do desenvolvimento deste trabalho, relativamente à forma como o valor da velocidade de escoamento obtido pela técnica de micro-PIV é afetado pela diferença do índice de refração entre o fluido e o material do canal onde se encontra em escoamento. Para confirmar e garantir a grandeza do efeito da diferença do índice de refração entre os dois meios seria necessário realizar mais ensaios com o canal de PDMS e a solução aquosa de DMSO a 52% (w/w) impondo caudais volumétricos diferentes na bomba de seringa, assim como, usar outros pares de meios com índices de refração idênticos.



## 5. Conclusão

O trabalho apresentado teve como objetivo a caracterização do escoamento de um fluido com propriedades físicas (massa volúmica e viscosidade) semelhantes à do sangue em canais retos de secção circular com dimensões próximas das veias. A técnica (ótica não intrusiva) de visualização usada para o desenvolvimento deste estudo foi a velocimetria por imagem de micropartículas (micro-PIV).

Na primeira fase do trabalho experimental, onde se realizou a familiarização com o equipamento e técnica de micro-PIV, foi possível tirar algumas conclusões no que diz respeito às medições e ao tratamento das imagens obtidas. Através dos resultados obtidos nos ensaios onde se controlou o caudal por diferença de alturas entre a superfície livre do líquido de duas seringas, concluiu-se que, a limpeza adequada de todo o material e um reduzido tempo de duração da actividade experimental, constituem um fator determinante na qualidade das imagens.

Para além disso, concluiu-se da importância de otimizar as condições de aquisição sempre que há alteração das condições de operação, isto porque nos ensaios onde o tempo entre pulsos do laser não foi otimizado, as partículas não se deslocaram 25% da área da AI e por essa razão os vetores do mapa revelaram-se pouco definidos.

Em todos os ensaios realizados, da análise e comparação dos perfis de velocidades medidos com o perfil de velocidade parabólico esperado para o regime laminar, numa forma adimensionalizada, concluiu-se que o fluido se encontrou a escoar em regime laminar e que as medições foram efetuadas em planos próximos do eixo do canal. Em todos os ensaios onde se impôs um caudal de escoamento na bomba de seringa, verificou-se que os perfis de velocidade obtidos para diferentes valores de  $y$  (direção do escoamento) dentro do mesmo ensaio são muito semelhantes, concluindo-se que o fluido se encontrou a escoar em regime laminar e permanente.

Através da realização de três ensaios repetidos, onde se obtiveram imagens para os mesmos planos de focagem e se mantiveram constantes todas as condições de aquisição, constatou-se que os resultados obtidos foram reproduzidos, sendo a dispersão de resultados em torno da média do caudal obtida nas três repetições da experiência, em termos percentuais, inferior a 4,58%. Esta análise indica uma boa reprodutibilidade entre os resultados obtidos nas três experiências realizadas com este equipamento em condições semelhantes, pelo que, a metodologia implementada na preparação e execução das experiências, assim como no tratamento das imagens adquiridas com vista ao mapa de vectores foi eficaz. Com isto conclui-

se que existe a possibilidade de reprodutibilidade entre experiências realizadas no equipamento de micro-PIV.

Averiguou-se ainda a influência do índice de refração nas medições, tendo-se chegado à conclusão que nas medições onde o índice de refração do fluido que se encontra em escoamento é diferente do índice de refração do material do canal, estas vêm afetadas de um erro que se deve ao fenómeno de refração da luz que atravessa dois meios diferentes. É possível detetar este erro aquando da integração numérica dos perfis de velocidade, pois, quando se trata de índices de refração diferentes entre os dois meios (canal e fluido), o caudal obtido não corresponde ao caudal que foi imposto na bomba de seringa.

No entanto, para se confirmar e garantir a grandeza do efeito da diferença do índice de refração entre os dois meios seria necessário realizar mais ensaios com o canal de PDMS e a solução aquosa de DMSO a 52% (w/w), impondo caudais volumétricos diferentes na bomba de seringa. Outra forma seria estudar o mesmo fenómeno mas com o canal de acrílico, utilizando a solução de iodeto de zinco a 61,8% (w/w), tal como foi proposto no Capítulo 4, uma vez que esta tem um índice de refração idêntico ao do acrílico.

## Bibliografia

- Adrian, R. e Yao, C. 1985.** Pulsed laser technique application to liquid and gaseous flows and the scattering power of seed materials. *Appl Optics*. 24, 1985, pp. 42-52.
- Adrian, R. J. 2005.** Twenty years of particle image velocimetry. *Exp Fluids*. 39, 2005, pp. 159-169.
- Adrian, Ronald J. 1991.** Particle-imaging techniques for experimental fluid mechanics. *Annual Review of Fluid Mechanics*. 1991, Vols. 23:261-304.
- Allard, L., et al. 2009.** Multimodality vascular imaging phantoms: a new material for the fabrication of realistic 3D vessel geometries. 2009, pp. 3758-3763.
- . 2009. Multimodality vascular imaging phantoms: a new material for the fabrication of realistic 3D vessel geometries. *Med Phys*. 2009, pp. 3758-3763.
- Anastasiou, A. D., et al. 2012.** Experimental investigation of the flow of a blood analogue fluid in a replica of a bifurcated small artery. *Medical Engineering & Physics*. 2012, pp. 212-218.
- Bale-Glickman, J., et al. 2003.** Experimental Flow Studies in Exact-Replica Phantoms of Atherosclerotic Carotid Bifurcations Under Steady Input Conditions. *J Biomech Eng*. 125, 2003, Vol. 1, pp. 38-48.
- Ballesteros, L.E. e Ramirez, L.M. 2008.** Morphological expression of the left coronary artery: a direct anatomical study. *Folia Morphol (Warsz)*. 67, 2008, Vol. 2, pp. 135-42.
- Bartoli, J. R., et al. 1999.** Filmes Ópticos Poliméricos Fluorados com Índice de Refração Gradual. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. 1999, pp. 148-155.
- Bayraktar, Tuba e Pidugu, Srikanth. 2006.** Characterization of liquid flow in microfluidic systems. *International Journal of heat and mass transfer*. 2006, Vols. 49: 815 - 824.
- Buchmann, N. A., et al. 2011.** Tomographic particle image velocimetry investigation of the flow in a modeled human carotid artery bifurcation. *Experiments in fluids*. 2011, pp. 1131-1151.
- Budwig, R. 1994.** Refractive index matching methods for liquid flow investigations. *Experiments in Fluids*. 17, 1994, pp. 350-355.
- Burgmann, S., et al. 2009.** A refractive index-matched facility for fluid–structure interaction studies of pulsatile and oscillating flow in elastic vessels of adjustable compliance. *Experiments in fluids*. 47, 2009, Vols. (4-5), pp. 865-881.
- Burst, M. 2013.** *Rheological Properties of Red Blood Cells*. 2013.
- Burst, M., et al. 2013.** Rheology of Human Blood Plasma: Viscoelastic Versus Newtonian Behavior. *Phys Rev*. 7, 2013, Vol. 110, p. 078305.
- Caro, C., et al. 1978.** *The mechanics of the circulation*. s.l. : Oxford University Press, 1978.
- Cavalcanti, J.S., Oliveira, M.L. e Pais, A.V. 1955.** Anatomic variations of the coronary arteries. *Arq Bras Cardiol*. 65, 1955, Vol. 6, pp. 489-92.

- Chaichana, Thanapong, Sun, Zhonghua e Jewkes, James . 2011.** Computation of hemodynamics in the left coronary artery with variable angulations. *Journal of Biomechanics*. 44, 2011, pp. 1869-1878.
- Chatzizisis, Y.S., Coskun, A.U. e Jonas, M. 2007.** Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior. *J Am Coll Cardiol*. 49, 2007, Vol. 25, pp. 2379-93.
- Cidre, Diana C. M. . 2008.** *Estudo do Escoamento Sanguíneo em microcanais com bifurcações*. 2008. Bolsa de Integração na Investigação (BII).
- Cloutier, G, et al. 2004.** A multimodality vascular imaging phantom with fiducial markers visible in DSA, CTA, MRA, and ultrasound. *Med Phys*. 2004, pp. 1424-1433.
- Costa, Erica Doutel. 2016.** *Hemodynamics in the Left Coronary Artery - numerical and in vitro approaches*. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto , Universidade do Porto . Porto : s.n., 2016. Tese de Doutorado.
- Costa, João Paulo Pereira. 2009.** *Caracterização cinemática e dinâmica de escoamentos estacionários em micro-canais rectos e micro-válvulas com recurso à técnica  $\mu$ PIV e à simulação numérica*. Engenharia Mecânica, Instituto Superior Técnico. 2009. Tese de Mestrado.
- Dantec Dynamics. 2015.** *Dynamic Studio Software Manual*. 2015.
- DANTEC. 2015.** *Micro scale velocity measurements*. s.l. : Nova instruments, 2015.
- DGS. 2017.** *Programa nacional para as doenças cérebro-cardiovasculares*. 2017. pp. 5-5.
- Dombe, D.D., et al. 2012.** Clinically relevant morphometric analysis of left coronary artery. *International Journal of Biological and Medical Research (IJBM)*. 3, 2012, pp. 1327-1330.
- Edlén, B. 1965.** The Refractive Index of Air. *Metrologia*. 2, 1965, Vol. 2.
- Fahraeus, R. e Lindqvist, T. 1931.** The viscosity of the blood in narrow capillary tubes. *American Journal of Physiology*. 1931, Vols. 96: 562-568.
- Fayad, Z. e Fuster, V. 2001.** Clinical imaging of the high-risk or vulnerable atherosclerotic plaque. *Circulation Research* . 89, 2001.
- Fox, C., Davies , M.J. e Webb-Peploe, M.M. 1973.** Length of left main coronary. *Br Heart J*. 35, 1973, Vol. 8, pp. 796-8.
- Gad-el -Hak, Mohamed. 2005.** *The MEMS handbook* . s.l. : CRC Press, 2005.
- Gad-el-Hak, Mohamed. 1999.** The fluid mechanics of microdevices—the Freeman Scholar Lecture. *Journal of Fluids Engineering*. 1999, Vols. 121: 5-33.
- Gailloud, Philippe, et al. 1999.** In Vitro Models of Intracranial Arteriovenous Fistulas for the Evaluation of New Endovascular Treatment Materials. 1999, pp. 291-295.
- Garcia, Valdemar, Dias, Ricardo e Lima, Rui. 2012.** In Vitro Blood Flow Behaviour in Microchannels with Simple and Complex Geometries. *Applied Biological Engineering - Principles and Practice*. 2012, pp. 393-416.
- Geoghegan, P. H., et al. 2012.** Fabrication of rigid and flexible refractive-index-matched flow phantoms for flow visualisation and optical flow measurements. 2012, pp. 1331-1347.
- Guimarães, M. 2015.** *Mathematical perspective in a geometrical optics*. 2015. Tese de mestrado.
- Haeberle , S. e Zengerle , R. 2007.** Microfluidic platforms for lab-on-a-chip applications. *PubMed*. 9:1094-1110, 2007, Vol. 7.
- Hendriks, F. e Aviram, A. 1982.** Use of zinc iodide solutions in flow research. *Review of Scientific Instruments* 53, 75 (1982);. 1, 1982, Vol. 53, pp. 75-78.
- Hetsroni, G., et al. 2005.** Fluid flow in micro-channels. *International Journal of Heat and Mass Transfer*. 2005, Vols. 48: 1982-1998.
- Jiwon, Lee, Paek, Jungwook e Jaeyoun , Kim. 2012.** Sucrose-based fabrication of 3D-networked, cylindrical microfluidic channels for rapid prototyping of lab-on-a-chip and vaso-mimetic devices. 2012, pp. 2638-3642.
- Kalpana, R. 2003.** A study on principal branches of coronary artery in humans. *J Anat. Soc. India*. 52, 2003, Vol. 2, pp. 137-140.



- Kandlikar, Satish , et al. 2006.** *Heat Transfer and Fluid Flow in Minichannels and Microchannels*. India : Elsevier, 2006.
- Kiger, Ken. 2005.** Introduction of Particle Image Velocimetry. *Burgers Program for fluid dynamics Turbulence School*. University of Maryland : s.n., 2005.
- Knox, K., et al. 2005.** Rapid prototyping to create vascular replicas from CT scan data: making tools to teach, rehearse, and choose treatment strategies. 2005, pp. 47-53.
- Koeppen , Bruce M. e Staton, Bruce A. 2008.** *Berne & Levy Physiology*. Canada : Elsevier Health Sciences, 2008.
- Ku, David N. 1997.** Blood flow in arteries. *Annual Review of Fluid Mechanics*. 32, 1997, Vol. 1, pp. 399-434.
- Lai, Wing T. e Menon, Rajan K. 2004.** *Flow measurements in microchannels using a micro-PIV system*. The University of Sydney, Sydney, Australia : TSI incorporated, 2004. pp. 1-2, 15th Australasian Fluid Mechanics Conference.
- Lima, R., et al. 2012.** Blood flow behaviour in microchannels: past, current and future trends. *Single and two-phase flows on Chemical and Biomedical EGINEERING*. 2012, Vols. 513-547.
- Lima, R., et al. 2008.** In vitro blood flow in a rectangular PDMS microchannel: experimental observations using a confocal micro-PIV system. *Biomedical Microdevices*. 2008, Vols. 10(2): 153-67.
- Lopes, David Alexandre Martins. 2012.** *Caracterização experimental da dinâmica e da organização celular de escoamentos estacionários de sangue animal em microcanais rectos*. Engenharia Mecânica, Instituto Superior Técnico . 2012. Tese de Mestrado.
- Loukas, M., Groat, C. e Khangura, R. 2009.** The normal and abnormal anatomy of the coronary arteries. *Clin Anat*. 22, 2009, Vol. 1, pp. 114-28.
- MacAlpin, R.N., et al. 1973.** Human coronary artery size during life. A cinearteriographic study. *Radiology*. 108, 1973, Vol. 3, pp. 567-576.
- Massey, B. S. 2002.** *Mecânica dos Fluidos*. Lisboa : Fundação Calouste Gulbenkian, 2002.
- Meynart, R. 1983.** Mesure de champs de vitesse d'écoulements fluides par analyse de suites d'images obtenues par diffusion d'un feuillet lumineux. Université Libre de Bruxelles : s.n., 1983. Thèse de doctorat en Sciences Appliquées.
- Minamiyama, M. 2000.** In Vivo Microcirculatory Studies: In Vivo Video Images of microcirculation. [Online] 2000. <http://www.ne.jp/asahi/minamiya/medicine/>.
- Oliveira, P. R., Pinho, F. T. e Pinto, G. A. 1998.** Numerical simulation of non-linear elastic flows with a general collocated finite-volume method. *Jornal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*. 79, 1998, pp. 1-43.
- Olsen, M. G. e Adrian, R. J. 2000.** Out-of-focus effects on particle image visibility and correlation in microscopic particle image velocimetry. *Exp Fluids*. 29, 2000, pp. S166-S174.
- Peng, X. F. e Peterson, G. P. 2006.** Convective heat transfer and flow friction for water flow in microchannel structures. *International Journal of Heat and Mass Transfer*. 2006, pp. 49: 815 - 824.
- Pihl, J., et al. 2005.** Microfluidics for cell-based assays. *Materials today*. 12:46-51, 2005, Vol. 8.
- Rade , D.J. e Daugherty, A. 2008.** Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature*. 451, 2008, Vol. 7181, pp. 904-13.
- Raffel, Markus, et al. 1998.** *Particle Image Velocimetry: A Pratical Guide*. s.l. : Springer-Verlag, 1998.
- Ramanathan, T. e Skinner, H. 2005.** Coronary blood flow. Continuing Education in Anaesthesia. *Critical Care & Pain*. 5, 2005, Vol. 2, pp. 61-64.
- Rampling, M. W. 2007.** Compositional Properties of blood. *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*. 2007, Vol. 69, pp. 34-44.
- . 2007. History of Hemorheology. *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*. 2007, Vol. 69, pp. 3-17.

- Reig, J. e Petit, M. 2004.** Main trunk of the left coronary artery: anatomic study of the parameters of clinical interest. *Clin Anat.* 17, 2004, Vol. 1, pp. 6-13.
- Rogers, E. W., et al. 1980.** Evaluation of left coronary artery anatomy in vitro by cross-sectional echocardiography. *Circulation.* 62, 1980, Vol. 4, pp. 782-787.
- Rudmann, Sally V. 2005.** *Text book of Blood Banking and Transfusion Medicine.* Philadelphia, Pennsylvania : Elsevier Saunders, 2005.
- Santiago, J. G., et al. 1998.** A particle image velocimetry system for microfluidics. *Experiments in fluids.* February de 1998, pp. 316-319.
- Sengupta, Anupam. 2007.** Flow measurment techniques. Indian Institute of Technology, Bombay : Department of Mechanical Engineering, 2007.
- Silva, Sofia Nogueira Lima. 2005.** *Flow around a single Taylor bubble rising through stagnant and co-current.* Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto. Porto : s.n., 2005. Tese de Doutoramento.
- Sousa, P. C., et al. 2013.** Shear viscosity and nonlinear behavior of whole blood under large amplitude oscillatory shear. *Biorheology.* 5-6, 2013, Vol. 50, pp. 269-282.
- Taylor, Charles A. e Draney, Mary T. 2004.** Experimental and computacional methods in cardiovascular filluid mechanics. 2004, pp. 197-231.
- The infuence of the non-Newtonian properties of blood on the flow in large arteries: unsteady fow in a 90 curved tube.* **Gijsen, F. J. H., et al. 1999.** 1999, Journal of Biomechanics, pp. 705-713.
- Toner, M. e Irimia, D. 2005.** Blood-on-a-Chip. *Annual Review of Biomedical Engineering.* 2005, Vols. 7: 77-103.
- Townsend, Nick, et al. 2016.** Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. *European Heart Journal.* 2016, Vol. 37, pp. 3232-3245.
- VanderLaan, P.A., Reardon, C.A. e Getz, C.S. 2004.** Site specificity of atherosclerosis: site-selective responses to atherosclerotic modulators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24, 2004, Vol. 1, pp. 12-22.
- Verpoorte, Elisabeth e Rooij , Nico F. 2003.** Microfluidics meets MEMS. *Proceedings of the IEEE.* 2003, Vols. 91: 930-953.
- Waite, L. e Fine, J. M. 2007.** *Applied Biofluid Mechanics.* s.l. : McGraw-Hill Education, 2007.
- Wereley , S. T. e Meinhart, C. D. 2005.** *Micron-Resolution Particle Image Velocimetry.* s.l. : Springer Berlin Heidelberg, 2005. pp. 51-112.
- Wereley, S. T., Meinhart , C. D. e Gray, M. H. B. 1999.** *Depth effects in volume illuminated particle image velocimetry.* Santa Barbara, USA : Third international workshop on particle image velocimetry, 1999.
- Wereley, S. T., Gui, L. e Meinhart, C. D. 2002.** Advanced Algorithms for Microscale Particle Image Velocimetry. *AIAA JOURNAL.* June de 2002, pp. 1047-1055.
- Wetzel, Stephan G., et al. 2005.** From Patient to Model: Stereolithographic Modeling of the Cerebral Vasculature Based on Rotational Angiography. *American Journal of Neuroradiology.* 2005, pp. 1425-1427.
- Whitesides, G. M. 2006.** The origins and the future of microfluidics. *Nature.* 368-373, 2006, Vol. 442.
- Wu, Peiyi e Little, W. A. 1984.** Measurement of the heat transfer characteristics of gas flow in fine channel heat exchangers used for microminiature refrigerators. *Cryogenics.* August de 1984, pp. 24:415-420.
- Zélicourt, D., et al. 2005.** In vitro flow analysis of a patient-specific intraatrial total cavopulmonary connection. *Ann Thorac Surg.* 79, 2005, Vol. 6, pp. 2094-2102.
- Zelicourt, D., et al. 2005.** Single-step stereolithography of complex anatomical models for optical flow measurements. *J Biomech Eng.* 127, 2005, Vol. 1, pp. 204-207.

## **Anexos**



## Anexo A - Calibração dos botões do microscópio

A calibração dos botões do microscópio permite encontrar uma relação entre as voltas dadas nos botões e o deslocamento do revólver. No manual do microscópio é dada a informação de que 35 voltas do botão micrométrico correspondem ao deslocamento máximo do revólver (da posição mais baixa à mais elevada), que é de 7 mm. Manuseando o botão do microscópio verificou-se que 1 volta do botão macrométrico equivale a 10 voltas do botão micrométrico. Através desta análise conclui-se que cada volta do botão micrométrico equivale a um deslocamento de 0,2 mm ( $= 7 \text{ mm}/35$ ) e, sabendo que cada volta corresponde a 100 divisões, cada divisão equivale a 0,002 mm.

A calibração foi efetuada de duas formas, a primeira onde se utilizou o canal de acrílico que foi fornecido pelo fabricante do equipamento (apresentado na Figura 19 - (a) e de características descritas na Tabela 8), e a segunda onde foi utilizado um comparador, que mediu diretamente o deslocamento do revólver enquanto se manuseou os botões. Dentro da última, foram utilizados dois comparadores, o primeiro com uma resolução às centésimas (modelo 543-682 da marca Mitutoyo com uma resolução de 0,01 mm) e o segundo com uma resolução às milésimas (modelo ID-C112B da marca Mitutoyo com uma resolução de 0,002 mm).

Os valores lidos no comparador com resolução às centésimas para as diferentes voltas durante a calibração do botão micrométrico encontram-se indicados na Tabela A1.

**Tabela A1 - Número de voltas dadas no parafuso micrométrico e respetivos valores lidos no comparador (com resolução às centésimas), no sentido descendente e ascendente.**

Sentido descendente (da posição máxima para a posição mínima)			Sentido ascendente (da posição mínima para a posição máxima)		
Nº de voltas	Valor lido (mm)	Diferença (mm)	Nº de voltas	Valor lido (mm)	Diferença (mm)
Posição inicial	6,66		34	0,07	0,13
1	6,47	0,19	33	0,20	0,20
2	6,27	0,20	32	0,40	0,18
3	6,07	0,20	32	0,58	0,19
4	5,88	0,19	31	0,77	0,19
5	5,68	0,20	30	0,96	0,19
6	5,48	0,20	29	1,15	0,19
7	5,29	0,19	28	1,34	0,20
8	5,09	0,20	27	1,54	0,19
9	4,89	0,20	26	1,73	0,19
10	4,69	0,20	25	1,92	0,20
11	4,50	0,19	24	2,12	0,19
12	4,30	0,20	23	2,31	0,18
13	4,12	0,18	22	2,49	0,19
14	3,92	0,20	21	2,68	0,19
15	3,73	0,19	20	2,87	0,19
16	3,53	0,20	19	3,06	0,19
17	3,32	0,21	18	3,25	0,20
18	3,12	0,20	17	3,45	0,19
19	2,93	0,19	16	3,64	0,19
20	2,74	0,19	15	3,83	0,20

21	2,54	0,20	14	4,03	0,19
22	2,35	0,19	13	4,22	0,19
23	2,15	0,20	12	4,41	0,19
24	1,96	0,19	11	4,60	0,19
25	1,76	0,20	10	4,79	0,19
26	1,56	0,20	9	4,98	0,19
27	1,35	0,21	8	5,17	0,19
28	1,16	0,19	7	5,36	0,19
29	0,97	0,19	6	5,55	0,19
30	0,78	0,19	5	5,74	0,19
31	0,58	0,20	4	5,93	0,19
32	0,40	0,18	3	6,12	0,19
33	0,20	0,20	2	6,31	0,19
34	0,07	0,13	1	6,50	0,13
Média		0,19			0,19

Os valores lidos no comparador com resolução às milésimas para as diferentes voltas durante a calibração do botão micrométrico encontram-se indicados na Tabela A2.

**Tabela A2 - Número de voltas dadas no parafuso micrométrico e respetivos valores lidos no comparador (com resolução às milésimas), no sentido descendente e ascendente.**

Sentido descendente (da posição máxima para a posição mínima)			Sentido ascendente (da posição mínima para a posição máxima)		
Nº de voltas	Valor lido (mm)	Diferença (mm)	Nº de voltas	Valor lido (mm)	Diferença (mm)
Posição inicial	3,311				
1	3,448	0,137			
2	3,638	0,190			
3	3,829	0,191			
4	4,018	0,189	Posição final	3,320	0,145
5	4,201	0,183	31	3,465	0,195
6	4,395	0,194	30	3,660	0,193
7	4,584	0,189	29	3,853	0,200
8	4,778	0,194	28	4,053	0,189
9	4,976	0,198	27	4,242	0,199
10	5,163	0,187	26	4,441	0,199
11	5,352	0,189	25	4,640	0,196
12	5,544	0,192	24	4,836	0,206
13	5,733	0,189	23	5,042	0,196
14	5,915	0,182	22	5,238	0,205
15	6,100	0,185	21	5,443	0,188
16	6,293	0,193	20	5,631	0,194
17	6,483	0,190	19	5,825	0,195
18	6,680	0,197	18	6,020	0,197
19	6,871	0,191	17	6,217	0,201
20	7,054	0,183	16	6,418	0,197

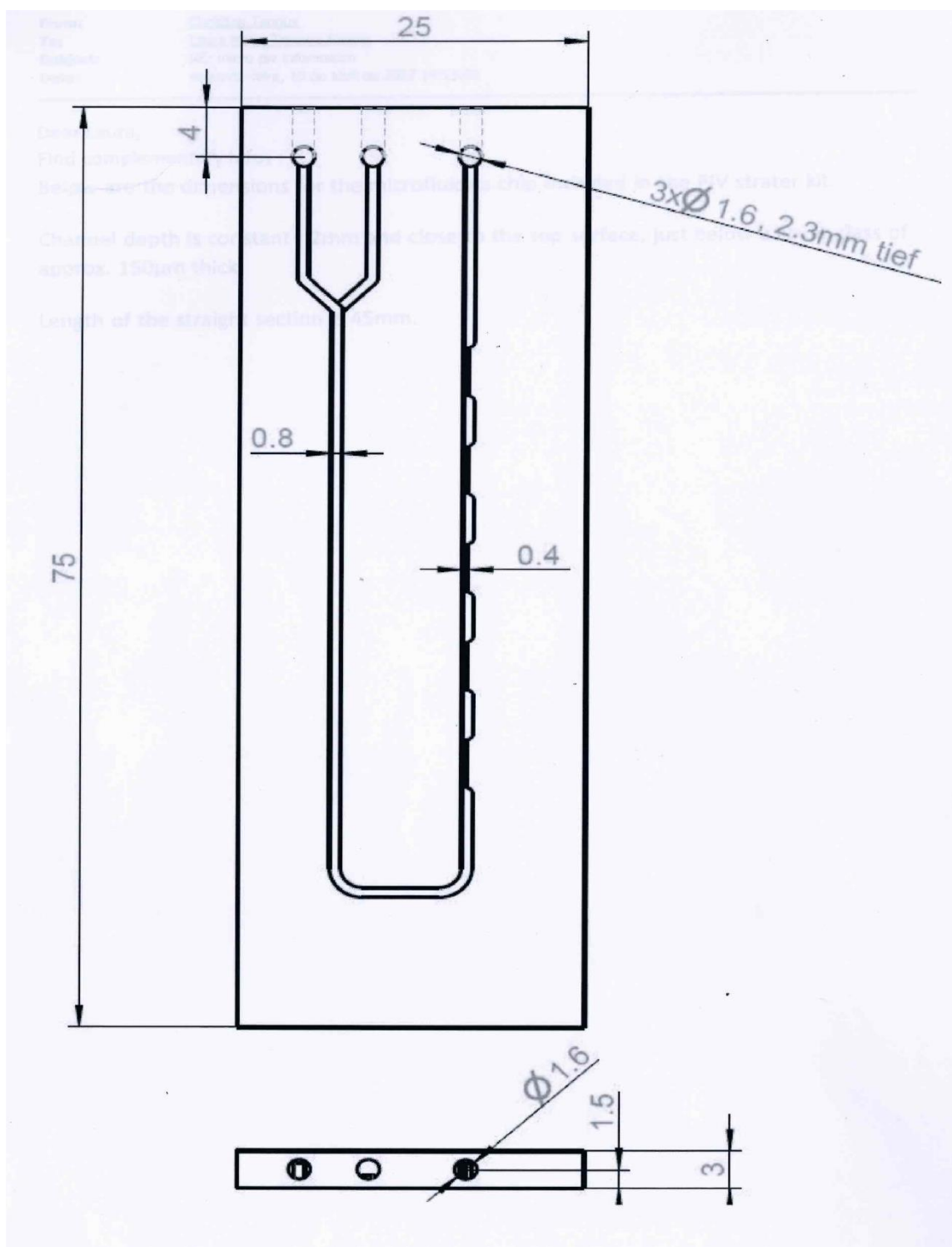
Sentido descendente (da posição máxima para a posição mínima)			Sentido ascendente (da posição mínima para a posição máxima)		
Nº de voltas	Valor lido (mm)	Diferença (mm)	Nº de voltas	Valor lido (mm)	Diferença (mm)
21	7,248	0,194	15	6,615	0,205
22	7,435	0,187	14	6,820	0,199
23	7,618	0,183	13	7,019	0,197
24	7,809	0,191	12	7,216	0,203
25	7,999	0,190	11	7,419	0,191
26	8,193	0,194	10	7,610	(a)
27	8,379	0,186	9	8,012	0,2
28	8,568	0,189	8	8,212	0,201
29	8,759	0,191	7	8,413	0,192
30	8,933	0,174	6	8,605	0,195
31	9,121	0,188	5	8,800	0,198
32	9,310	0,189	4	8,998	0,193
33	9,496	0,186	3	9,191	0,197
34	9,686	0,190	2	9,388	0,196
35	9,829	0,143	1	9,584	0,193
Média		0,189			0,197

(a) - valor desprezado por se encontrar em incoerência com os restantes.

## Anexo B - Dimensões do canal de acrílico

O canal de acrílico foi fornecido pelo fabricante do equipamento de micro-PIV, a *Dantec Dynamics*, cujas dimensões se encontram na Figura 1B.

Figura 1B - Dimensões do canal de acrílico.





## Anexo C - Determinação do caudal volumétrico por medição experimental

Determinou-se o caudal volumétrico experimental equivalente à diferença de altura de 10 cm entre a superfície livre do líquido no interior de duas seringas através da contabilização do tempo necessário para a obtenção de um volume de 1 cm<sup>3</sup> recolhido numa proveta graduada de 5mL com uma incerteza de 0,1 mL.

Tabela 1C - Determinação do caudal volumétrico por medição experimental.

Volume recolhido (cm <sup>3</sup> )	Tempo (min)	Caudal (cm <sup>3</sup> /min)	Caudal médio (cm <sup>3</sup> /min)
1,0	3,00	0,333	0,337
	3,17	0,315	
	2,75	0,364	

Da análise da Tabela 1C verifica-se que o caudal volumétrico obtido por medição experimental é de 0,337 mL/min.

## Anexo D - Calibração da bomba de seringa

Antes de realizar as medições foi efetuada a calibração da bomba de seringa. Para este fim, encheu-se a seringa com água destilada e impôs-se diferentes caudais na bomba, recolhendo-se o volume numa proveta e anotando o tempo que esta demorou a encher. Para os caudais menores (de 0,180 mL/min a 0,220 mL/min) utilizou-se uma seringa de 20 mL e uma proveta de 10,0 mL e para os caudais mais elevados (de 14 mL/min a 16 mL/min), uma seringa de 100 mL e uma proveta de 25,0 mL. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 1D.

Tabela 1D - Calibração da bomba de seringa.

Caudal imposto (mL/min)	Volume recolhido (mL)	Tempo total (min)	Caudal (mL/min)	Caudal médio (mL/min)
0,180	2,8	14,2	0,197	0,205
	3,5	16,1	0,218	
	3,0	15,0	0,200	
0,200	2,0	9,8	0,205	0,204
	3,0	14,6	0,205	
	2,5	12,3	0,203	
0,220	2,3	10,4	0,221	0,221
	4,1	18,6	0,220	
	3,7	16,8	0,221	
15,000	20,9	1,33	15,675	15,675
	17,0	1,08	15,692	
	19,0	1,22	15,616	
14,000	20,0	1,42	14,118	14,074
	19,0	1,35	14,074	
	21,0	1,50	14,000	
16,000	20,8	1,27	16,421	16,286
	20,9	1,28	16,286	
	25,0	1,55	16,129	